

Modificaciones en la composición de la pared celular
de frutos de cerezo dulce (*Prunus avium* L.):
incidencia del estado ontogénico y del cultivar.

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción vegetal con orientación en cultivos intensivos*

Gloria Silvia Salato
Ingeniera Agrónoma – Universidad de Buenos Aires - 2006

Lugar de trabajo: Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Carlos A. Stortz

Licenciado en Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

Enrique E. Sánchez

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional del Sur)

Ph. D. (Oregon State University)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Carlos Arturo Stortz

Licenciado en Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Gabriela Calvo

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae en Producción Vegetal (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

José Alfredo Curá

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 23 de Octubre de 2012

Dedicatoria

*A mis padres Raúl y Silvia por su sacrificio,
valores y ejemplo de personas, que sin ellos no
hubiese cumplido mi sueño de ser quien soy.*

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Stortz quien tuvo la responsabilidad de dirigirme en este trabajo y a toda la gente que trabaja en su laboratorio en el CIHIDECAR-CONICET (Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA), quienes de una forma u otra participaron en mi entrenamiento y me ayudaron en todo momento, y en especial a la Dra. Andrea Ponce por su continuo apoyo y supervisión.

A mi director de beca el Lic. Gustavo Trinchero, quien fue un gran apoyo técnico y además humano para seguir adelante con la Tesis y a docentes y no docentes de la cátedra de Bioquímica quienes me brindaron su apoyo en los momentos difíciles.

A todo el personal de la cátedra de Horticultura quienes me dieron mucho aliento para seguir adelante, y también un lugar allí para poder continuar con mi trabajo.

A las Ing. Agr. Dolores Raffo y Liliana San Martino del EEA INTA Alto valle y AER INTA Los Antiguos que aportaron material para este trabajo.

A mi amor Juanjo por ser mi sostén y consejero en todo momento.

A todos mis amigos y en especial a Carina por estar siempre presente.

A mis compañeros de trabajo Soledad, Nacho y Hubert por ser excelentes compañeros y personas íntegras.

A todos ¡GRACIAS! por que aprendí muchísimo de ustedes

Declaración de trabajo original

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.”

Gloria Silvia Salato

INDICE GENERAL

Índice de cuadros	ix
Índice de figuras	xi
Índice de fotografías	xiii
Lista de abreviaturas y siglas.....	xiv
Resumen.....	xvi
Abstract	xvii

Capítulo 1

Introducción general

1.1 Importancia del cultivo de cerezas en Argentina.....	1
1.2 Características de los frutos.....	1
1.3 Características de las variedades de cerezo bajo estudio.....	3
1.3.1 Cerezos ‘Newstar’.....	3
1.3.2 Cerezos ‘Sweetheart’.....	3
1.4 Factores determinantes de la textura de los frutos: importancia de la pared celular	4
1.5 Estructura de la pared celular	5
1.5.1 Modelos de pared celular primaria.....	9
1.5.2. Modificaciones de la constitución de la pared celular durante el crecimiento y maduración de los frutos	12
1.5.3 Características y consecuencias del daño mecánico sobre los frutos.....	13
1.6 Objetivos e hipótesis	15
1.6.1 Objetivos.....	15
1.6.2 Hipótesis de trabajo	15

Capítulo 2

Cambios durante el crecimiento y maduración de las cerezas dulces: relación entre la pérdida de firmeza y la estructura de la pared celular.

2.1 Introducción.....	17
2.1.1 Las investigaciones sobre pared celular de cerezas.....	17
2.2 Materiales y Métodos.....	18
2.2.1 Material vegetal.....	18
2.2.2 Índices fisiológicos, índices de madurez y calidad durante ontogenia.....	19
2.2.2.1 Contenido de sólidos solubles.....	19
2.2.2.2 Peso y diámetro ecuatorial.....	19

2.2.2.3 Firmeza.....	19
2.2.3 Extracción, fraccionamiento y análisis de la pared celular	19
2.2.3.1 Metodología de extracción de la pared celular.....	19
2.2.3.2. Fraccionamiento de polisacáridos de la pared celular.....	20
2.2.3.3 Análisis químicos.....	20
2.2.3.3.1 Métodos colorimétricos.....	20
2.2.3.3.2 Métodos cromatográficos.....	22
2.2.4 Análisis estadístico.....	23
2.3 Resultados.....	24
2.3.1 Evolución del peso, firmeza y porcentaje de sólidos solubles de los frutos durante ontogenia.....	24
2.3.2 Extracción secuencial de pared celular.....	26
2.3.3. Cambios en el contenido de ácidos urónicos y azúcares neutros de la pared celular de cerezas firmes y blandas durante ontogenia.....	27
2.3.3.1 ‘Sweetheart’.....	27
2.3.3.2 ‘Newstar’.....	30
2.3.4 Cambios en la composición y concentración de azúcares neutros a través de la ontogenia del fruto.....	32
2.3.4.1 ‘Sweetheart’.....	32
2.3.4.2 ‘Newstar’.....	33
2.3.5. Despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes.....	37
2.3.5.1 ‘Newstar’.....	37
2.3.5.2 ‘Sweetheart’.....	40
2.4 Discusión.....	44
2.5 Conclusiones.....	47

Capítulo 3

Efecto de los daños mecánicos producidos en cerezas dulces (*Prunus avium* L.) sobre la composición de la pared celular de los frutos.

3.1 Introducción.....	49
3.2 Materiales y métodos.....	50
3.2.1 Material vegetal.....	50
3.2.2 Índices fisiológicos, índices de madurez de cerezas.....	50
3.2.2.1 Diámetro ecuatorial.....	50
3.2.2.2. Firmeza.....	50

3.2.2.3 Color.....	50
3.2.2.4 Contenido de sólidos solubles.....	51
3.2.3 Extracción, fraccionamiento y análisis de pared celular (Ver Capítulo 2 punto 2.4.3).....	51
3.2.4 Análisis estadístico.....	51
3.3 Resultados.....	51
3.3.1 Características físicas de las cerezas firmes y blandas (‘Sweetheart’ y ‘Newstar’).....	51
3.3.2 Efecto del daño mecánico sobre la pared celular de cerezas firmes y blandas (‘Sweetheart’ y ‘Newstar’).....	52
3.3.2.1 Extracción secuencial de pared celular.....	52
3.3.3. Solubilización, composición de azúcares neutros y despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes de la pared celular de cerezas ‘Newstar’.....	53
3.3.4 Solubilización, composición de azúcares neutros y despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes de la pared celular en cerezas ‘Sweetheart’.....	62
3.4 Discusión.....	70
3.5 Conclusiones.....	72

Capítulo 4

Conclusiones generales.....	73
4.1 Implicancias agronómicas de los resultados obtenidos.....	76
4.2 Aportes originales surgidos de la tesis.....	77
4.3 Posibles líneas de investigación generadas a partir de este trabajo.....	78

Capítulo 5

Bibliografía.....	80
-------------------	----

INDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1 Rendimiento del residuo insoluble en alcohol cada 100g de peso fresco de frutos blandos ('Newstar') y firmes ('Sweetheart') durante ontogenia (estadios I a IV).....	26
Cuadro 2.2 Fracciones extraídas de cerezas 'Sweetheart' a través de los distintos estadios de crecimiento (I-IV) expresadas en g/100g AIR.....	27
Cuadro 2.3 Fracciones extraídas de cerezas 'Newstar' en los distintos estadios de crecimiento (I-IV) expresadas en g / 100 g AIR.....	27
Cuadro 2.4 Contenido de ácidos urónicos en porcentaje (%) y en miligramos por gramo de AIR en las fracciones de pared celular de cerezas 'Sweetheart' durante diferentes estadios (I-IV) de su ontogenia.....	28
Cuadro 2.5 Contenido de azúcares neutros en miligramos por gramo de AIR y en porcentaje (%) en las fracciones de pared celular de cerezas 'Sweetheart' durante diferentes estadios (I-IV) de su ontogenia.....	29
Cuadro 2.6 Contenido de ácidos urónicos en mg/g de AIR y en porcentaje (%) en las fracciones de pared celular de cerezas 'Newstar' durante diferentes estadios de su ontogenia.....	31
Cuadro 2.7 Contenido de azúcares neutros en mg/g de AIR y porcentaje (%) en las fracciones de pared celular de cerezas 'Newstar' durante diferentes estadios de su ontogenia.....	31
Cuadro 2.8 Composición de azúcares neutros en moles %, de las fracciones pécicas y de glicanos de la matriz en cada uno de los estadios de crecimiento (I: división celular, II: esclerificación del endocarpo III: crecimiento exponencial, IV: Madurez) de cerezas Sweetheart.....	33
Cuadro 2.9 Composición de azúcares neutros en moles %, de las fracciones pécicas y de glicanos de la matriz en cada uno de los estadios de crecimiento (I: división celular, II: esclerificación del endocarpo III: crecimiento exponencial, IV: Madurez) de cerezas 'Newstar'.....	34
Cuadro 2.10 Contenido total de azúcares neutros y ácidos urónicos (expresados en mg/g de AIR) en cada uno de los estadios de crecimiento (I: división celular, II: esclerificación del endocarpo III: crecimiento exponencial, IV: Madurez) de cerezas blandas cv Newstar y firmes cv Sweetheart.....	37
Cuadro 3.1 Comparación de diámetro, firmeza, porcentaje de sólidos solubles y color (L*,C*,h°) de cerezas cv. Sweetheart y Newstar a cosecha.....	51
Cuadro 3.2 Rendimiento del Residuo Insoluble en Alcohol (AIR) cada 100g de peso fresco de frutos firmes (cv. Sweetheart) y blandos (cv. Newstar), expuestos a daño mecánico (D) y testigo (T), muestreados a los 7 y 10 días después de iniciado el tratamiento	52
Cuadro 3.3 Fracciones extraídas de cerezas 'Newstar' en frutos dañados (D) y testigo (T) a los 7 y 10 días de realizado el tratamiento expresadas en g/100g AIR.....	53

Cuadro 3.4 Fracciones extraídas de cerezas ‘Sweetheart’ en frutos dañados (D) y testigo (T) a los 7 y 10 días de iniciado el tratamiento expresadas en g/100g AIR.....	53
Cuadro 3.5 Contenido de ácidos urónicos en miligramos por gramo de AIR en las fracciones de pared celular de cerezas ‘Newstar’ en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.....	54
Cuadro 3.6 Contenido de ácidos urónicos en porcentaje (%) en las fracciones de pared celular de cerezas ‘Newstar’ en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.....	54
Cuadro 3.7 Contenido de azúcares neutros en miligramo por gramo de AIR de las fracciones de pared celular de la variedad Newstar en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.....	55
Cuadro 3.8 Contenido de azúcares neutros en porcentaje (%) de las fracciones de pared celular de la variedad Newstar en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.	56
Cuadro 3.9 Composición de azúcares neutros en moles % de cerezas ‘Newstar’, en las fracciones de pared celular de frutos dañados (D) y testigos (T) a los 7 y 10 días de iniciado el tratamiento.....	57
Cuadro 3.10 Contenido de ácidos urónicos en miligramos por gramo de AIR de las fracciones de pared celular de cerezas ‘Sweetheart’ en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de realizado el tratamiento.....	62
Cuadro 3.11 Contenido de ácidos urónicos en porcentaje (%) de las fracciones de pared celular de cerezas ‘Sweetheart’ en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de realizado el tratamiento.....	63
Cuadro 3.12 Contenido de azúcares neutros en miligramos por gramo de AIR de las fracciones de pared celular de cerezas ‘Sweetheart’ en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.....	63
Cuadro 3.13 Contenido de azúcares neutros en porcentaje (%) de las fracciones de pared celular de cerezas ‘Sweetheart’ en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.....	64
Cuadro 3.14 Composición de azúcares neutros en moles % de cerezas ‘Sweetheart’, en las fracciones de pared celular de frutos dañados (D) y testigos (T) a los 7 y 10 días de iniciado el tratamiento.....	65
Cuadro 4.1 Resumen de la comparación entre variedades de cerezas dulces firmes y blandas para las diferentes variables analizadas durante el crecimiento y maduración del fruto y cuando la fruta fue dañada mecánicamente. ++ a + representan una escala de mayor a menor contenido o intensidad.....	76

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Homogalacturonano, formado por unidades de ácido D-galacturónico unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y pueden estar esterificados en la posición C-6 con metanol en distintos grados. (Carpita y Mc Cann 2000).....	7
Figura 1.2 Xilogalacturonano compuesto de una estructura de ácido D-galacturónico unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y ramificaciones de D-xilosa (en celeste). (Carpita y Mc Cann 2000).....	7
Figura 1.3 Ramnogalacturonano I (RG-I) compuesto por unidades disacarídicas repetitivas de $(1\rightarrow2)$ α -D-Ram- $(1\rightarrow4)\alpha$ -D-GalA presentando 3 tipos de cadenas laterales: arabinanos ramificados, galactanos y arabinogalactanos tipo I. (Carpita y Mc Cann 2000).....	8
Figura 1.4 RG-II es un polímero complejo que consta de 4 grupos de polisacáridos (A-D) con alrededor de 20 tipos de uniones (Mohnen 2008)	9
Figura 1.5 Pared celular Tipo I (Carpita y Mc Cann 2000).....	11
Figura 2.1 Curva de crecimiento (peso expresado en gramos), diámetro ecuatorial (mm), contenido de sólidos solubles (%) y firmeza (N) de frutos de las variedades Newstar (A, C, E y G) y Sweetheart (B, D, F y H) desde cuaje hasta madurez (días después de plena floración). Los valores representan las medias y las barras verticales indican error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre fechas y variedades ($p<0.05$)	25
Figura 2.2 Relación Ara/Gal (A) y (Ara/Gal)/Ram (B) de pectinas y glicanos entrecruzantes de la pared celular de cerezas ‘Newstar’. Las barras contiguas representan los 4 estadios de desarrollo.....	35
Figura 2.3 Relación Ara/Gal (A) y (Ara/Gal)/Ram (B) de pectinas y glicanos de matriz de la pared celular de cerezas ‘Sweetheart’. Las barras contiguas representan los 4 estadios de desarrollo.....	36
Figura 2.4 Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos blandos (cv. Newstar) de la fracción H_2O durante ontogenia, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B.....	38
Figura 2.5 Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos blandos (cv. Newstar) de las fracciones CDTA y Na_2CO_3 durante ontogenia, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-2B.....	39
Figura 2.6 Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos blandos (cv. Newstar) de las fracciones KOH 4% y KOH 24% durante el crecimiento, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B.....	40
Figura 2.7 Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos firmes (cv Sweetheart) de la fracción H_2O durante ontogenia, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B.....	41
Figura 2.8 Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos firmes (cv. Sweetheart) de las fracciones CDTA y Na_2CO_3 durante ontogenia, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-2B.....	42

Figura 2.9 Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos firmes (cv. ‘Sweetheart’) de las fracciones KOH 4% y KOH 24% durante el crecimiento, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B.....	43
Figura 3.1 Contenido de azúcares neutros y ácidos urónicos en miligramos por gramo de AIR de cerezas ‘Newstar’, de los tratamientos Dañados (D 7d y D 10d) y Testigos (T 7d y T 10d) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.....	58
Figura 3.2 Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos blandos (cv Newstar) de la fracción H ₂ O, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. Frutos testigos (T) y frutos dañados (D) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.....	59
Figura 3.3 Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos blandos (cv. Newstar) de las fracciones CDTA y Na ₂ CO ₃ , fraccionadas en una columna de Sepharose CL-2B. Frutos testigos (T) y frutos dañados (D) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.....	60
Figura 3.4 Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos blandos (cv. Newstar) de las fracciones KOH 4% y KOH 24%, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. Frutos testigos (T) y frutos dañados (D) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.....	61
Figura 3.5 Contenido de azúcares neutros y ácidos urónicos en miligramos por gramo de AIR de cerezas Sweetheart, de los tratamientos Dañados (D 7d y D 10d) y Testigos (T 7d y T 10d) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.....	66
Figura 3.6 Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos firmes (cv Sweetheart) de la fracción H ₂ O, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. Frutos testigo (T) y frutos dañados (D) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento....	67
Figura 3.7 Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos firmes (cv. Sweetheart) de las fracciones CDTA y Na ₂ CO ₃ , fraccionadas en una columna de Sepharose CL-2B. Frutos testigo (T) y frutos dañados (D) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.....	68
Figura 3.8 Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos firmes (cv. Sweetheart) de las fracciones KOH 4% y KOH 24%, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. Frutos testigos (T) y frutos dañados (D) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.....	69

INDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1 Cerezas ‘Newstar’	3
Fotografía 2 Cerezas ‘Sweetheart’	4

Listado de siglas y abreviaturas

AGA	apiogalacturonano
AIR	Residuo insoluble en alcohol
AIS	Sólidos insolubles en alcohol
Ara	arabinosa
AX	arabinoxilanos
atm	atmósfera
cADN	ADN complementario
CDTA	ácido trans-1,2- diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacético
cm	centímetro
cv	cultivar
D	dañado
ddpf	días después de plena floración
Dha	ácido 3-desoxi-D- <i>lixo</i> -2-heptulosárico
d.i.	diámetro interno
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FID	Flame ionization detector (Detector de ionización de llama)
Fuc	fucosa
g/g	gramo/gramo
Gal	galactosa
GAX	glucoarabinoxilanos
Glc	glucosa
GX	glucoronoxilanos
ha	hectárea
HG	homogalacturonanos
Kdo	ácido 3-desoxi-D- <i>mano</i> -2-octulosónico
KOH	hidróxido de potasio
M	molar
Man	manosa
mM	milimolar
mm	milímetro
msnm	metros sobre el nivel del mar
N	newton

PF	peso fresco
PG	poligalacturonasa
PME	pectinmetilesterasa
Psi	Pounds per square inch (libras por pulgada cuadrada)
p/v	peso/volumen
Ram	ramnosa
RG I	Ramnogalacturonano tipo I
RG II	Ramnogalacturonano tipo II
SEC	Size exclusion chromatography
SS	sólidos solubles
T	testigo
TFA	ácido trifluoroacético
XGA	xilogalacturonano
Xil	xilosa
vs.	versus

Resumen

Durante la ontogenia de las cerezas dulces (*Prunus avium* L.) se producen cambios que conducen a la maduración y al ablandamiento del fruto, asociados a una modificación en la composición de la pared celular, ocurriendo de forma diferenciada en cerezas firmes y blandas. Esta característica también incide en la resistencia de estos frutos a los daños mecánicos, disminuyendo o aumentando la susceptibilidad al daño. El objetivo del trabajo fue analizar los cambios en la pared celular durante la ontogenia y en respuesta al daño por impacto en cerezas con firmeza contrastante. Se determinaron la solubilización, despolimerización y composición de pectinas y glicanos entrecruzantes de la pared celular, en cuatro estadios durante la ontogenia de cerezas firmes cv Sweetheart y blandas cv Newstar. Estas determinaciones también se realizaron a madurez comercial, en frutos expuestos a la simulación del daño por impacto, al caer libremente desde una altura de 70 cm, y se tomaron muestras 7 y 10 días después de producido el daño. Durante la ontogenia de los frutos blandos, se produjo la pérdida de ácidos urónicos (solubilización), despolimerización de glicanos entrecruzantes y pérdida de azúcares neutros, mientras que en los frutos firmes se observaron la despolimerización de glicanos entrecruzantes y la pérdida de azúcares neutros. El efecto del daño mecánico produjo en los frutos blandos una disminución de los ácidos urónicos y la pérdida de azúcares neutros (arabinosa, galactosa y xilosa), como así también la despolimerización de pectinas y de glicanos entrecruzantes. En conclusión, en frutos blandos la solubilización de pectinas podría ser el mayor causante del ablandamiento y más aún cuando se produce la despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes después de producido el daño mecánico. Los frutos firmes presentaron una estructura péctica más conservada durante ontogenia y daño mecánico, sin variaciones en el contenido de cadenas laterales.

Palabras clave: ontogenia – *Prunus avium* L. – firmeza – pared celular – daño mecánico – pectinas – glicanos entrecruzantes

Abstract

During sweet cherry (*Prunus avium* L.) ontogeny, modifications leading to fruit ripening and softening are associated to compositional changes in cell wall, occurring in a different manner in firm and soft sweet cherries. These characteristics also influence fruit resistance to mechanical damage, lowering or increasing the susceptibility to damage. The aim of this work was to analyze cell wall changes during ontogeny, and in response to impact damage in sweet cherries with contrasting firmness. Solubilization, depolymerization and sugar composition of pectin and matrix glycans were analyzed, in four stages of fruit development in firm and soft sweet cherries cv. Sweetheart and Newstar respectively. These analysis were also performed after impact damage simulation by dropping the fruit from a height of 70 centimetres, with samples taken 7 and 10 days after the impact. Loss of uronic acids (solubilization), matrix glycans depolymerization and loss of neutral sugars were found in soft fruits whereas matrix glycans depolymerization and loss of neutral sugars were found in firm fruits during ontogeny. After mechanical damage treatment, uronic acids and neutral sugars (arabinose, galactose and xylose) were lost as well as pectin depolymerization and also matrix glycans depolymerization were observed. In conclusion, the solubilization of pectins in soft fruits could affect softening, mostly when pectins and matrix glycans depolymerization occurs after mechanical damage. In contrast, firm fruits maintain its pectin structure during ontogeny and under mechanical damage without variations in the content of pectin side chain.

Key words: ontogeny – *Prunus avium* L. – firmness – cell wall – mechanical damage – pectins – matrix glycans

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE CEREZAS EN ARGENTINA

En la Argentina, la producción de cerezas ha crecido notablemente en la última década y se encuentra en expansión. Según el Censo Nacional Agropecuario 2002, había en el país 2200 ha implantadas con cerezos, siendo Mendoza, con 1275 ha, la provincia con mayor superficie de este cultivo y responsable del 80 % de la producción del país. Siguen en orden de importancia los Valles de la Norpatagonia (Provincias de Neuquén y Río Negro) con algo más de 500 ha y los Valles de la Región Patagonia Sur (Provincias de Chubut y Santa Cruz) con 325 ha (Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas 2009). Sin embargo, actualmente se contabilizan alrededor de 3000 ha implantadas (INTA Alto Valle, Ing. Dolores Raffo, comunicación personal). Recientemente en la Provincia de Buenos Aires, especialmente en la zona sudeste, cerca de Mar del Plata y en los alrededores de Bahía Blanca también se registran algunas plantaciones de cerezos.

A nivel nacional se produjo alrededor de 6800 tn (FAOSTAT, 2009) de cerezas en el año 2009, presentándose variaciones anuales según las condiciones climáticas (nieve, heladas) que afectan en gran medida la producción. Si bien el rendimiento es bajo, menos de 2,5 tn por ha, los factores ambientales y el hecho que las nuevas plantaciones no se encuentren en plena producción aún, dan idea del potencial productivo de este cultivo en el país.

Actualmente, gran parte de la producción argentina de cerezas es comercializada en el mercado interno, siendo 'Bing' la variedad con mayor volumen ofertado (> 66%), mientras que otra parte de la producción se destina a industrialización para la elaboración de cerezas al marrasquino y mermeladas. En cuanto al mercado externo, las cerezas se cuentan entre las once frutas más exportadas de la Argentina (Altube et al. 2007) y el volumen de exportaciones alcanzan las 2500 tn (FAOSTAT 2008) llegando a mercados como Inglaterra, Rusia y Alemania entre otros. Un factor que favorece dichas exportaciones es el hecho de producir en contraestación al hemisferio Norte.

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS FRUTOS

La cereza es un fruto de carozo, perteneciente a la familia de las Rosáceas, subfamilia Prunoideas, en la cual también se encuentran los duraznos, nectarinas, ciruelas y damascos. Sin embargo, está considerada dentro del grupo de la fruta fina y comparte una característica fundamental dentro de este grupo como ser la alta perecibilidad y por ende una acotada vida en postcosecha, las cuales están relacionadas con su moderada tasa respiratoria ($10\text{-}20 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). La comercialización de esta y otras frutas hacia países europeos debe sortear esta característica para que llegue a los mercados en buen estado, o sea manteniendo las características organolépticas hasta llegar al consumidor final. En los últimos años las investigaciones se están orientando sobre cuáles son los factores de precosecha y postcosecha que afectan la calidad del fruto ya que la vida en postcosecha no alcanza más de 4-6 semanas utilizando frío, combinado en ocasiones con atmósferas modificadas, y por ende esta fruta debe ser

rápida transportada hasta su destino, utilizándose a menudo el transporte aéreo por su rapidez.

El cerezo es uno de los primeros frutales caducifolios en madurar en verano y la época de cosecha de esta fruta es relativamente corta comparada con otros frutales, ya que rige desde mediados de noviembre hasta enero, según zona de producción y variedad. Su ontogenia se extiende entre 60 y 80 días desde la floración hasta la madurez, dependiendo del cultivar (Tukey 1942). Presenta una curva de crecimiento sigmoidea doble como ocurre con otros frutos de carozo, pero se distingue de los demás por ser más acotado el tiempo de desarrollo. En esta curva se pueden distinguir tres etapas: etapa I, de activa división celular; etapa II, se produce el endurecimiento del endocarpo o carozo y crecimiento del embrión y etapa III caracterizada por la elongación celular y consecuente aumento del tamaño del fruto de forma exponencial. Al final de esta etapa de maduración de la cereza dulce ocurre un rápido incremento en el tamaño y el peso de la fruta, la cual adquiere hasta un 25% del peso final durante la semana previa a la cosecha, a la vez que se registran cambios drásticos en el color, sabor y textura del mismo (Looney et al. 1996a).

A diferencia de otros frutos como las peras y manzanas que acumulan carbohidratos de reserva como el almidón, las cerezas acumulan azúcares simples (en gran proporción glucosa y fructosa) durante su maduración. Esos monosacáridos contribuyen a la percepción de la dulzura (que se mide como %SS o °Brix); conjuntamente con el nivel de acidez (dada fundamentalmente por la presencia de ácido málico), determinan el sabor característico del fruto. El ácido málico es el ácido orgánico de mayor contribución a la acidez en las especies de *Prunus*, como ciruelas, duraznos, damascos y nectarinas (Crisosto 1994). En contraste a estos frutos donde la acidez disminuye a través del desarrollo y maduración del fruto, en cerezas se produce una acumulación de ácido málico (Serrano et al 2005).

Como se mencionó anteriormente, la tasa respiratoria de esta fruta es moderada. Es bien conocido que este proceso utiliza como sustrato, entre otros, a los carbohidratos y en consecuencia una vez cosechada la fruta, una elevada tasa respiratoria podría disminuir el contenido de azúcares simples, afectando el sabor característico y por ende la calidad de la fruta, contrariamente a lo que ocurre en manzanas (Looney et al. 1996a). Debido a que la cereza es un fruto no climatérico, luego de cosechada no presenta el pico climatérico o respiratorio y de producción de etileno. En consecuencia el proceso de maduración no prosigue luego de separar al fruto de la planta, por lo que debe estar fisiológica y organolépticamente maduro al momento de su recolección. Por otra parte, se sabe que la acumulación de azúcares simples no continúa una vez arrancado de la planta (Campana 2007).

Algunos autores han estudiado la evolución de la firmeza en cerezas, y observaron que la misma disminuye marcadamente desde estadios tempranos coincidentes con el alargamiento celular (Choi et al. 2002b; Serrano et al. 2005). Estas observaciones, unidas al hecho de ser un producto muy perecedero dan idea de la importancia que tiene utilizar las mejores técnicas de postcosecha para mantener su calidad.

En cerezas como en otros frutos, se utilizan índices de madurez específicos, que se relacionan directamente con el estado ontogénico del fruto en el cual es posible comenzar a cosechar. Los índices utilizados son el color (como método no destructivo), la firmeza (Esti et al. 2002) y el contenido de sólidos solubles (%SS o °Brix) (como métodos destructivos). Todos ellos permiten determinar el momento de cosecha

oportuno, aunque el valor óptimo de estos índices puede variar según el cultivar y el mercado al cual se destine.

1.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS VARIEDADES DE CEREZO BAJO ESTUDIO.

Aunque existen más de 30 especies diferentes de cerezos, todas originadas en Europa y Asia, solamente 2 tienen relevancia comercial a nivel mundial. El cerezo dulce (*Prunus avium* L.), diploide ($2n = 2x = 16$), y el cerezo ácido o guindo (*Prunus cerasus* L.), tetraploide ($2n = 4x = 32$). El cerezo Duke es un híbrido natural entre las dos especies anteriores.

1.3.1 Cerezos ‘Newstar’

Es un cultivar autofértil seleccionado por W. D. Lane y S. Sansavini. Se origina por el cruzamiento de dos variedades: Van x Stella. Se trata de un árbol de vigor medio y de hábito de crecimiento abierto, de floración temprana y bajo requerimiento en horas de frío. El fruto es grande, más bien redondo, pero de poca firmeza (Fotografía 1). Se cosecha cuando el color de la piel se torna rojo intenso (Bargioni 1996; Sanz y Onofre 2007).

1.3.2 Cerezos ‘Sweetheart’

El árbol es vigoroso, autofértil. Fue seleccionado por W. D. Lane por cruzamiento entre ‘Van’ y ‘Newstar’. Es polinizadora universal. Es interesante desde el punto de vista comercial por su maduración tardía y su baja susceptibilidad al partido o “cracking”. Fue lanzado comercialmente en el año 1993 (Fotografía 2). El fruto es de tamaño medio a grande y el color de la piel y pulpa es rojo. Son crocantes y con muy buena firmeza y sabor.



Fotografía 1 Cerezas ‘Newstar’



Fotografía 2 Cerezas ‘Sweetheart’

1.4 FACTORES DETERMINANTES DE LA TEXTURA DE LOS FRUTOS: IMPORTANCIA DE LA PARED CELULAR

En las últimas décadas se brindó particular atención a los cambios texturales operados en los frutos que, por mucho, fueron estudiados a nivel mundial más intensamente que otros procesos fisiológicos. Esto no se debe a que se considere a la firmeza como un factor más importante que el color o el aroma para la calidad final de estos productos, sino porque un ablandamiento prematuro de los frutos determina que los mismos se deterioren rápidamente durante su vida en postcosecha, sucumbiendo a los daños mecánicos y a la acción de agentes patógenos, limitando sus posibilidades de transporte y almacenamiento y afectando, por lo tanto, con mayor gravedad e inmediatez la estructura de costos.

Los factores que afectan la firmeza de los frutos pueden clasificarse en dos grandes grupos (Harker et al. 1997): a) aquéllos relacionados con la producción (la variedad cultivada, el grado de madurez a la cosecha, las prácticas culturales como la fertilización, la aplicación de reguladores del crecimiento y la forma y régimen de riego, la exposición a la luz solar, exposición a distintas formas de estrés, etc.), y b) los factores relacionados con la estructura del tejido. Entre éstos últimos se destaca particularmente la composición química de la pared celular y la actividad de enzimas hidrolíticas de pared, si bien hay influencia de otros factores anátomo-histológicos, de la presión de turgencia, y de la integridad de la membrana celular. Existe suficiente evidencia para asegurar que las modificaciones en la firmeza que tienen lugar en los frutos y que, con frecuencia, los inhabilita para su comercialización, son provocadas principalmente por las modificaciones que se producen en los polisacáridos de la pared celular (Brummell 2006; Carpita y McCann 2000; Goulao y Oliveira 2008).

La integridad de la pared celular de los frutos puede atribuirse a la adhesión entre paredes de células contiguas y a la resistencia de la pared primaria. Se considera a la adhesión entre paredes de células contiguas como uno de los factores más críticos por su influencia en la percepción de la textura de los frutos. Según una clasificación clásica

(Bourne 1979), los frutos de climas templados se agrupan en dos grupos: I) los que se ablandan otorgando una textura fundente (ciruela, kiwi, tomate), y II) aquéllos que se ablandan sólo moderadamente, reteniendo una textura “quebradiza”, que otorga una sensación de fractura al ser cortada en la boca (manzana, nashi). En el grupo I, la adhesión entre células es pobre, y el tejido suele separarse por el desplazamiento relativo de unas células respecto de otras, con mínima ruptura de células; en el grupo II, la adhesión entre células es relativamente fuerte, y la separación de los tejidos se produce principalmente por ruptura de las paredes celulares.

Un avance significativo en la comprensión del comportamiento de la pared celular de los frutos resultó del análisis por microscopía electrónica de la dilatación que experimentan las paredes de frutos de distintas especies, tanto *in vivo* cuanto a partir del aislamiento de pared celular y de su tratamiento *in vitro* (Redgwell et al. 1997a). En frutos que muestran textura fundente (grupo I), la dilatación o “hinchamiento” de la pared celular resulta pronunciado, particularmente *in vitro*. En cambio, los frutos con textura quebradiza (grupo II) no muestran dilatación o hinchamiento de la pared celular. El kiwi tiene un comportamiento inusual, ya que manifiesta una dilatación marcada de la pared celular tanto *in vivo* como *in vitro*, en tanto que las ciruelas, la frutilla, el tomate y el caqui (todos pertenecientes al grupo I), muestran solamente una dilatación del material de pared celular *in vitro*. La cereza no fue incluida en ese estudio, aunque algunas variedades que tienen una textura blanda a la madurez se conservan mejor que aquéllas que tienen textura quebradiza (Batisse et al. 1996b), lo que sugiere cambios en la estructura interna de la pared celular misma.

1.5 ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR

La pared celular es una estructura macromolecular compleja propia del reino vegetal que envuelve y protege a las células actuando como barrera ante el ataque de patógenos y proveyéndolas de una forma estable. Además juega un papel importante en los procesos de división y expansión celular que determinan el crecimiento de los frutos y el tamaño final. La división y expansión de las células depende en parte de la elongación de la pared gracias a la activa síntesis de polisacáridos en el aparato de Golgi. En esta organela hay diversas enzimas encargadas de la síntesis de polisacáridos los cuales son secretados en vesículas hacia la pared contribuyendo así de material para el crecimiento de la misma. En la etapa de metafase de la división celular las vesículas se ubican en el plano ecuatorial del huso y a medida que se van acumulando se fusionan para formar luego la placa celular. Esta placa da lugar a la formación de la laminilla media la cual divide a las células, es rica en pectinas y es la capa exterior de la pared que actúa fijando las células debido al contacto con la laminilla media de las células contiguas. Durante el crecimiento, se forma la pared primaria hasta el momento en que se detiene el proceso y comienza a formarse la pared secundaria, que tiene un mayor espesor y es más rígida debido a la presencia de lignina en algunos tipos de células (Taiz y Zeiger 2002). A su vez cada una de estas capas está compuesta por polisacáridos relativamente simples y por otros más complejos como microfibrillas de celulosa, glicanos de matriz (llamados también hemicelulosas) y pectinas, pero además por otros biopolímeros complejos como proteínas estructurales, enzimas y compuestos fenólicos (Cafall y Mohnen 2009; Cosgrove 2001; Goulao y Oliveira 2008).

El polisacárido de mayor abundancia en la Tierra es la celulosa, la cual es una cadena lineal de unidades de D-glucopiranosas enlazadas con uniones $\beta(1\rightarrow4)$. Estas cadenas lineales presentan características propias de adosamiento con otras cadenas por

puentes hidrógeno, formando de ese modo estructuras cristalinas denominadas microfibrillas las cuales contienen docenas de cadenas lineales.

Otros de los componentes de la pared son las hemicelulosas, denominadas históricamente así debido a su parecido con la estructura de las cadenas de celulosa. Actualmente se considera más adecuado denominarlas glicanos de matriz (Carpita y McCann 2000; Scheller y Ulvskov 2010), los que en su mayoría presentan características químicas similares a las de la celulosa, es decir enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ sobre un oxhidrilo ecuatorial (glucosa y derivados, manosa o xilosa). Comúnmente se los clasifica desde el punto de vista operativo según su extractabilidad en glicanos débilmente y fuertemente unidos a la pared, dependiendo de la concentración de los solventes alcalinos utilizados para su extracción. Existen distintos tipos de glicanos clasificados de acuerdo a su estructura en: **xilanos**, se encuentran como polisacáridos principales no celulósicos en la pared primaria de monocotiledóneas comelinoides aproximadamente en un 20% y también en dicotiledóneas (Scheller y Ulvskov 2010), constituidos por cadenas lineales de unidades de xilosa sustituidas parcialmente con arabinosa y/o ácido glucurónico dando lugar a la formación de arabinoxilanos (AX) presentes en gran cantidad en las paredes celulares de gimnospermas, glucuronoarabinoxilanos (GAX) presentes en dicotiledóneas y monocotiledóneas comelinoides y glucuronoxilanos (GX) principalmente en pared celular secundaria de dicotiledóneas; **mananos** y **galactomananos**, están ampliamente difundidos en los angiospermas, tienen una estructura compuesta por una cadena principal de manosas enlazadas $1\rightarrow4$, en ocasiones parcialmente reemplazada por glucosa (**galactoglucomananos**), y sustituidas parcialmente por galactosa encontrándose además como el mayor componente en pared secundaria de gimnospermas; **xiloglucanos**, presentes en todas las plantas del reino vegetal excepto en carófitas y con mayor abundancia en la pared primaria de espermatófitas excepto en pastos (Scheller y Ulvskov 2010), compuestos por una cadena principal del tipo de la de celulosa, pero con cadenas laterales de α -D-xilosa unidas al C-6 de los residuos glucosídicos (Caffall y Mohnen 2009).

Por último, las pectinas son polímeros heterogéneos ricos en ácido D-galacturónico con enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ que pueden tener ramificaciones e interactúan con otros polímeros como glicanos entrecruzantes (especialmente xiloglucanos), compuestos fenólicos y proteínas de pared. Además se les adjudican diversas funciones como la determinación de la porosidad de la pared, la modulación del pH y el balance iónico debido a las superficies cargadas, regula la adhesión entre células (es un componente fundamental de la laminilla media) y sirven como moléculas señal ante el ataque de patógenos e insectos (Caffall y Mohnen 2009; Carpita y McCann 2000; Ridley et al. 2001). Se puede fraccionar las pectinas sabiendo que algunas se extraen directamente con agua, otras requieren agentes quelantes (pectinas iónicamente unidas), mientras que otras requieren ácidos o bases diluidos (pectinas covalentemente unidas).

Por distintas modificaciones de la cadena principal o de las cadenas laterales, se han definido diversos tipos de pectinas: **Homogalacturonanos** (HG), **Xilogalacturonanos** (XGA), **Ramnogalacturonano tipo I** (RG I), **Ramnogalacturonano tipo II** (RG II) y **Apiogalacturonanos** (AGA), éstos últimos exclusivos de plantas acuáticas. Los **homogalacturonanos** constan de una estructura lineal de ácido D-galacturónico con enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ con distintos grados de esterificación con metanol en C-6, dando lugar a una estructura helicoidal (Figura 1.1). Los residuos no esterificados en C-6 se encuentran negativamente cargados a pH fisiológico y puede interactuar con Ca^{2+} formando así un gel estable con otras moléculas

pécticas (modelo egg box). Este tipo de pectina se encuentra covalentemente unida a RG-I y RG-II y podría estar también unida a XGs.

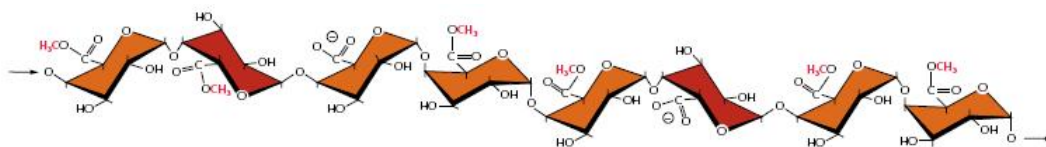


Figura 1.1 Homogalacturonano, formado por unidades de ácido D-galacturónico unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y pueden estar esterificados en la posición C-6 con metanol en distintos grados. (Carpita y Mc Cann 2000).

Los **xilogalacturonanos** tienen la misma estructura básica que los HG (llamados también galacturonanos sustituidos), pero poseen ramificaciones simples de D-xilosa sobre el O-3 de los residuos del ácido galacturónico (Figura 1.2). También existe la posibilidad de encontrar (como en *Pisum sativum*) xilosa unida al O-2 de otro residuo de xilosa, generando así ramificaciones disacarídicas (Le Goff et al. 2001).

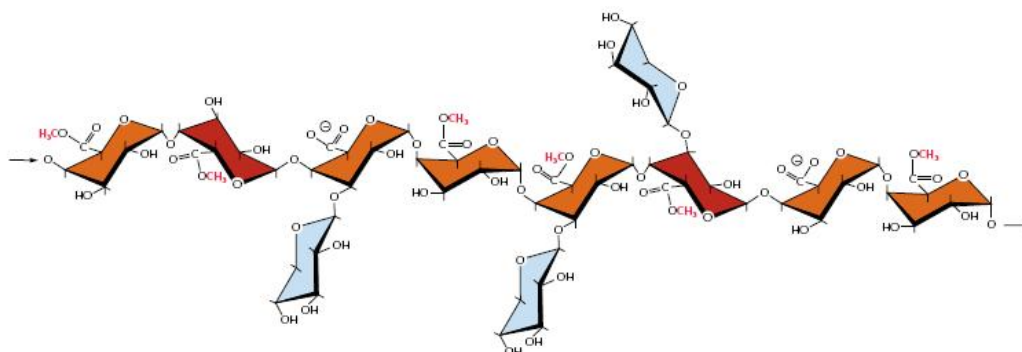


Figura 1.2 Xilogalacturonano compuesto de una estructura de ácido D-galacturónico unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y ramificaciones de D-xilosa (en celeste). (Carpita y Mc Cann 2000)

El polímero RG-I es una estructura compleja cuyo esqueleto contiene una unidad repetitiva disacarídica, esto es $\rightarrow 2)-\alpha$ -D-ramnosa-($1\rightarrow 4$)- α -D-GalA-($1\rightarrow$, la cual presenta como ramificaciones a otros tipos de polisacáridos como ($1\rightarrow 5$) α -L-arabinanos, ($1\rightarrow 4$)- β -D-galactanos y/o arabinogalactanos tipo I (AGs) unidos a la estructura fundamentalmente en la posición O-4 de los residuos de ramnosa (Figura 1.3). Este tipo de pectinas es muy abundante y a pesar de que se considera que están en una matriz independiente, hay evidencias que muestran las cadenas laterales de arabinanos y galactanos de RG-I asociadas a xiloglucanos y a las microfibrillas de celulosa por puentes hidrógeno in vitro (Brummell 2006; Jarvis 2011; Marcus et al. 2008; Oechslin et al. 2003; Zykwiniska et al. 2005).

Por último, otros de los polímeros presentes en la pared, aunque con menor abundancia, y también considerados galacturonanos sustituidos (al igual que los XGAs) son los RG-II, que constan de un esqueleto de ácido D-galacturónico con enlaces α -

(1→4) y 4 diferentes grupos laterales con 12 diferentes tipos de azúcares (Figura 1.4) entre los cuales se encuentran apiosa, ácido acérico, 2-*O*-metilfucosa, 2-*O*-metilxilosa, Kdo (ácido 3-desoxi-*D*-mano-2-octulosónico) y Dha (ácido 3-desoxi-*D*-lixo-2-heptulosárico) en pequeñas cantidades. Se puede presentar en forma de una unidad única, o asociado mediante uniones diéster mediadas por boro (B) formando dímeros. Es una estructura altamente conservada en las plantas y hay evidencias de que puede jugar un rol fundamental sobre todo en los tejidos reproductivos, teniendo en cuenta que el boro es un microelemento esencial.

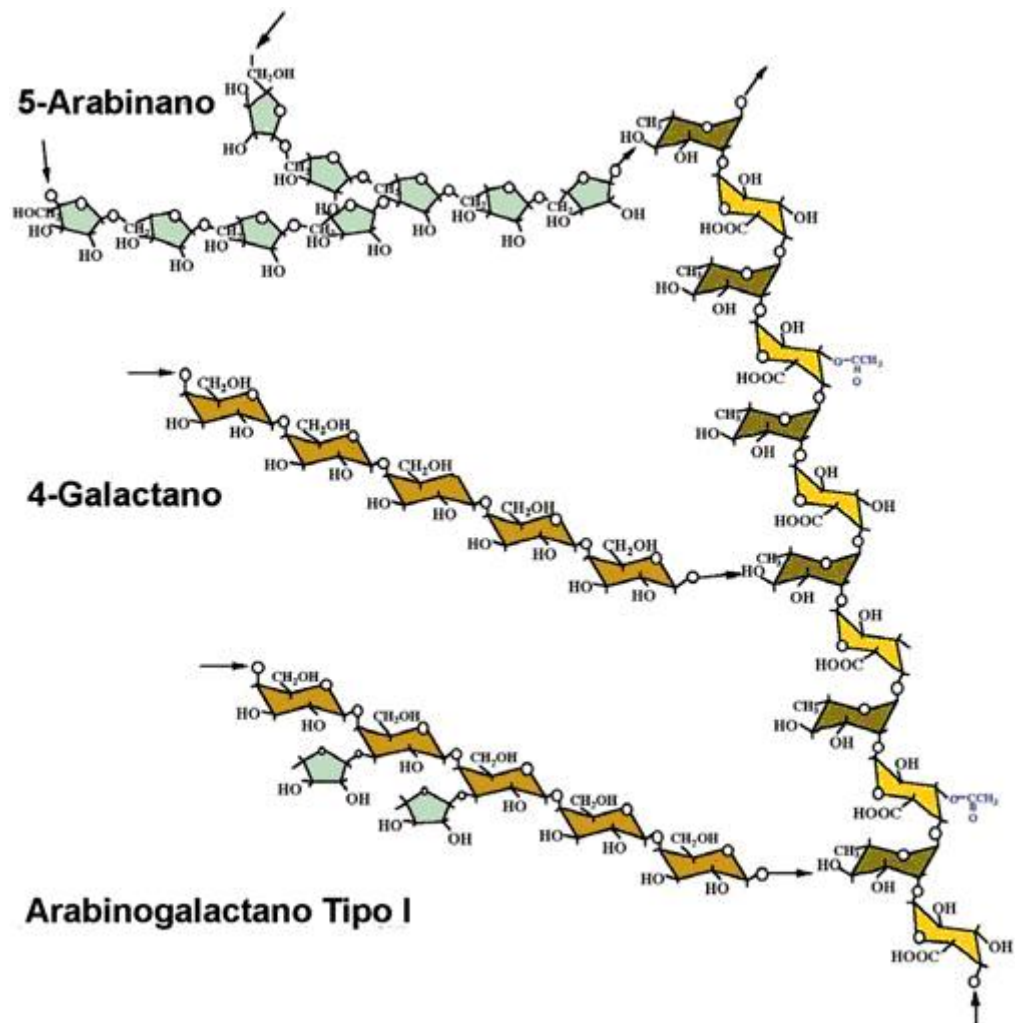


Figura 1.3 Ramnogalacturonano I (RG-I) compuesto por unidades disacarídicas repetitivas de (1→2) α -D-Ram-(1→4) α -D-GalA presentando 3 tipos de cadenas laterales: arabinanos ramificados, galactanos y arabinogalactanos tipo I. (Carpita y Mc Cann 2000)

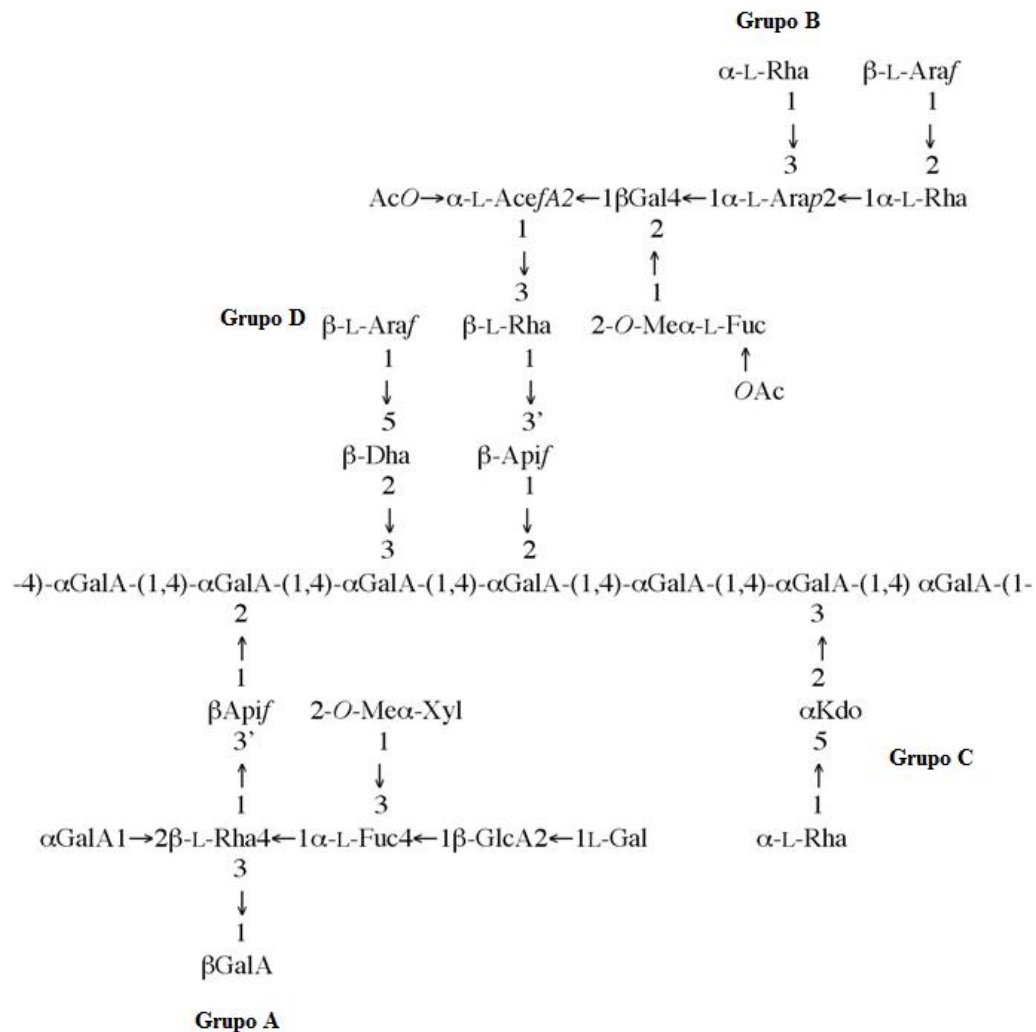


Figura 1.4 RG-II es un polímero complejo que consta de 4 grupos de polisacáridos (A-D) con alrededor de 20 tipos de uniones (Mohnen 2008)

1.5.1 Modelos de pared celular primaria.

Muchas investigaciones se concentran hoy en definir la estructura primaria de los polisacáridos individuales que representan el 90 % de la pared celular. Entre los obstáculos enfrentados se cuentan la complejidad de los polisacáridos y la dificultad en el aislamiento y purificación de los polímeros individuales. Desde los años 70 se han desarrollado varios modelos para describir la estructura de la pared (Brummell 2006; Cosgrove 2001). En los comienzos se aceptaba que existían enlaces covalentes entre los componentes de la pared celular (esto es proteínas, pectinas y glicanos entrecruzantes) pero que la unión de las microfibrillas de celulosa y los xiloglucanos estaba dada por puentes de hidrógeno los cuales hacen una unión suficientemente fuerte entre ellos (Keegstra et al. 1973). Sin embargo, se consideraba que no se podía probar a ciencia cierta la unión covalente entre pectinas y xiloglucanos. Más tarde Talbott y Ray (1992) presentan el **modelo multicapas** (*multicoat model*) donde cada microfibrilla de celulosa está cubierta por una serie de capas de polisacáridos que hacia el exterior se encuentran cada vez menos fuertemente unidos y el enlace entre microfibrillas se hace indirectamente por asociaciones laterales (no covalentes) entre distintas capas de polisacáridos. Otro modelo que proponen Ha y otros (1997) muestran una pared

estratificada donde los xiloglucanos cubren a las microfibrillas de celulosa y a su vez las pectinas sirven como espaciadores entre el complejo hemicelulosas-celulosa. En este modelo las pectinas actuarían regulando el espesor de la pared y facilitarían el deslizamiento entre las capas de hemicelulosas-celulosa, las cuales controlarían la extensión de la pared. Sin embargo, Carpita y Gibeaut (1993) habían presentado un modelo ampliamente aceptado hasta la actualidad, ya que contempla tanto los enlaces covalentes como los iónicos y define tres dominios importantes que son independientes pero que interactúan entre sí en la pared primaria. Estos dominios son: la interacción entre las microfibrillas de celulosa y xiloglucanos los cuales se encuentran embebidos en una matriz de polisacáridos pécticos y las proteínas estructurales o una red de fenilpropanoides. Este modelo se denomina **red pegajosa** (*sticky network*). En este modelo los autores diferencian entre dos tipos de pared celular: la de Tipo I (Figura 1.5) para dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas y la de Tipo II para poáceas y otras familias de monocotiledóneas estrechamente relacionadas.

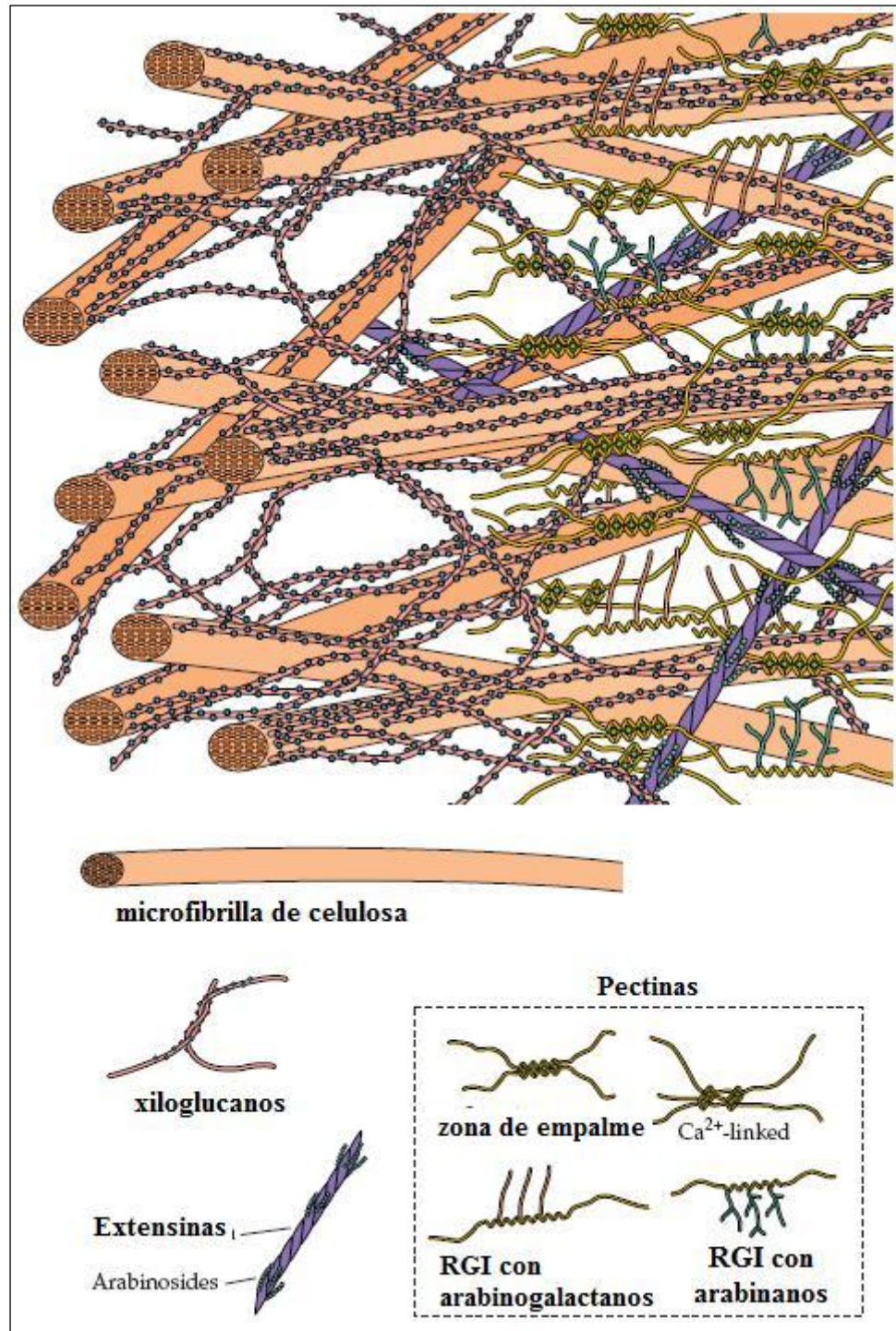


Figura 1.5 Pared celular Tipo I. (Carpita y Mc Cann 2000).

Teniendo en cuenta que el cerezo pertenece a la categoría de las dicotiledóneas el tipo de pared de referencia es el tipo I. La pared de tipo I, cuenta con diferentes estratos y está compuesta por xiloglucanos adheridos a las microfibrillas de celulosa y a su vez estos se conectan extendiéndose hacia otros xiloglucanos produciendo así el bloqueo de las microfibrillas en un arreglo espacial. A la vez, esto se encuentra inserto en una matriz de pectinas lo cual en su conjunto controla la porosidad de la pared dado que las cadenas helicoidales de HG se pueden condensar debido al catión Ca^{2+} formando las **zonas de empalme** (*junction zones*) entre dos cadenas antiparalelas y/o paralelas. Estas

zonas más el cruzamiento de los residuos de ramnosa del RG-I determinan la porosidad de la pared.

1.5.2 Modificaciones de la constitución de la pared celular durante el crecimiento y maduración de los frutos.

La tasa de crecimiento de los frutos varía de acuerdo a las condiciones ambientales de la estación, las prácticas culturales y aún entre frutos de un mismo cultivo (Pallardy 2008). Es así como el crecimiento se encuentra afectado tanto por las condiciones ambientales como genéticas y esto incide sobre la división y expansión celular.

El momento de maduración de frutos de carozo en general ocurre hacia el final de la tercera etapa de crecimiento donde se produce la expansión celular (Pallardy 2008) y en el caso de las cerezas en esta etapa se produce un rápido aumento del tamaño del fruto. Durante esta etapa se producen varios cambios, entre ellos el ablandamiento del fruto debido a la desintegración de la pared celular mientras que al mismo tiempo ocurre el crecimiento del fruto (Brummell 2006).

Los polisacáridos de las paredes celulares de los frutos son generalmente hidrofílicos y aún así, muchas de estas moléculas solubles en agua forman una estructura coherente insoluble en agua dentro de la pared. Por qué sucede esto y cómo las moléculas interactúan para acomodar los cambios necesarios para el crecimiento, maduración y senescencia de los frutos, son preguntas que tienen varias incógnitas hasta el presente.

Con el ablandamiento de la pulpa durante la maduración de los frutos, se suceden cambios en la pared celular que incluyen solubilización, despolimerización de pectinas y/o glicanos entrecruzantes y pérdida de azúcares neutros, principalmente galactosa (Batisse et al. 1996a; Goulao y Oliveira 2008; Gross y Sams 1984). No obstante, estos procesos ocurren de manera diferencial en las distintas especies de frutos. Como ejemplo, las manzanas durante la maduración conservan su rigidez debido a la baja separación entre células en comparación con el durazno en el cual el ablandamiento es mucho mayor debido al hinchamiento y pérdida de adhesión celular (Carpita y McCann 2000). En manzanas (*Malus domestica* Borkh.) también se ha observado que no se produce despolimerización de pectinas ni de hemicelulosas pero ésto sí ocurre en duraznos (Goulao y Oliveira 2008). En frutillas (*Fragaria x ananassa*, Duch. Dover), fruto no climatérico, se ha observado la despolimerización de glicanos entrecruzantes, pero no de pectinas (Hubert et al. 1984).

Otros autores (Brummell y Harpster 2001; Sozzi 2004) han estudiado otros frutos como durazno, palta, caqui, tomate, melón, pimienta, frutilla, etc. y concuerdan en que es común que ocurra la despolimerización de xiloglucanos y otros glicanos de la matriz (que componen junto con la celulosa la red estructural de la pared celular).

No se conoce la forma en que cada uno de los procesos contribuye a la dilatación de la pared, a la pérdida de su rigidez y a la disminución de la adherencia entre células contiguas, aunque muchos de estos procesos se asociaron a la acción de distintas enzimas hidrolíticas de la pared celular (Brummell y Harpster 2001; Rose et al. 2003; Sozzi y Civello 2005). Durante la maduración, la acción combinada de diferentes enzimas hidrolíticas sobre los componentes de la pared celular produce una disminución del contenido de dichos componentes, su solubilización o despolimerización, con eventual síntesis *de novo* de componentes nuevos, posiblemente de menor peso

molecular. En particular, las pectinas experimentan un aumento en su solubilidad debido a una disminución de su masa molecular o de sus interacciones covalentes con los demás componentes de la pared celular. La disminución y relajación de esta barrera mecánica no sólo reduce la firmeza del fruto sino que facilita la acción de los patógenos, particularmente en estadíos de madurez avanzados.

Si bien la biología molecular ha jugado un papel de importancia creciente en la investigación sobre la pared celular y el mejoramiento de la calidad textural de los frutos, los efectos de la supresión de la actividad de las enzimas de pared probaron no ser predecibles hasta el momento (Sozzi y Civello 2005). Más aún, desde 1988, año en que se dio a conocer el fracaso de la hipótesis de la endo-poligalacturonasa como única enzima responsable del ablandamiento de los frutos, la biología molecular sólo logró avances acotados en la comprensión de la arquitectura de la pared celular y/o de los mecanismos del ablandamiento de los frutos (Redgwell y Fischer 2002). A pesar de sus limitaciones, el análisis de los distintos componentes de la pared celular continúa siendo una de las principales herramientas de aproximación para la comprensión de la dinámica de dicha pared y el diseño de estrategias apropiadas para la conservación de los frutos durante la postcosecha.

En la mayoría de los estudios citados, se utilizaron cultivares que no tienen relevancia comercial en el mercado internacional. Hoy, existen variedades cultivadas de comportamiento contrastante en relación a la pérdida de firmeza, cuyo análisis permitiría verificar cuáles cambios en la pared celular se asocian más marcadamente con el ablandamiento. Asimismo, el desarrollo de nuevas técnicas para el análisis de los componentes de pared celular (Brummell et al. 2004; Filisetti-Cozzi y Carpita 1991) ha abierto posibilidades para estudiar más profundamente los cambios que se producen.

1.5.3 Características y consecuencias del daño mecánico sobre los frutos.

El estudio del efecto de los daños mecánicos y la forma de evitarlos es de vital importancia en lo que hace al manejo postcosecha de frutas ya que dichos daños representan pérdidas tanto en volumen como en valor de la fruta. Si bien hay otros tipos de daños, como el daño por frío, que se genera en las cámaras frigoríficas e impactan sobre la calidad de los frutos, los daños mecánicos pueden ocurrir en diversos momentos, ya sea al manipular durante la cosecha, línea de empaque y/o transporte (Kader y Mitchell 1989; Mencarelli et al. 1996; Van Zeebroeck et al. 2007; Zarifneshat et al. 2010) y pueden presentarse con mayor o menor gravedad según la especie y variedad.

Se pueden caracterizar estos daños de acuerdo a la forma en que se producen: por *compresión* debido a la presión ejercida entre frutos en la cosecha o mismo con el material de empaque; *impacto*, debido a la caída sobre una superficie o por la caída de un objeto sobre el fruto y por último los daños por *vibración*, que ocurren durante el transporte producto del movimiento del vehículo el cual produce una vibración o abrasión contra una superficie, material de empaque u otra fruta (Kader y Mitchell 1989). En los dos primeros tipos de daños se observa bajo la piel un oscurecimiento o amarronamiento del mesocarpo, mientras que en el último el efecto más notorio es el amarronamiento de la superficie del fruto. Pero no siempre aparecen los mismos síntomas en todos los frutos, por ejemplo en tomates los daños mecánicos no se visualizan fácilmente ya que la piel y el tejido interno no presentan cambios de color pero sí se produce el ablandamiento de la zona afectada (Van linden et al. 2006). En

kiwis el síntoma se observa en forma de V y de color blanco hacia el interior del tejido pero a medida que avanza la maduración se va oscureciendo (Mencarelli et al. 1996). En damascos el síntoma también se observa varios días después de producido el daño como un amarronamiento del mesocarpo (De Martino et al. 2002) al igual que en peras y manzanas (García et al. 1995).

En las cerezas, se producen daños por abrasión recibidos tempranamente en la misma planta por causa del roce del fruto contra una rama u otro fruto y también, durante el resto de la cadena de comercialización debido a la acción de los equipos de selección de fruta, cintas en el empaque y durante el transporte (vibración). Este síntoma se visualiza en la superficie del fruto por lo cual se descartan tempranamente. Por otra parte existe un desorden muy común en cerezas llamado *pitting*, el cual se presenta como un hundimiento o depresión de la piel del fruto que es observable luego de varios días de haberse producido el daño físico. Por debajo de la piel, las células dañadas colapsan y se deshidratan. Este tipo de daño mecánico es producto de fuerzas de impacto o compresión y es menos evidente en cerezas oscuras donde el síntoma se “esconde” debido al color rojo oscuro del tejido y en consecuencia no se detecta rápidamente (Looney et al. 1996a).

Como consecuencia de los daños mecánicos se produce un incremento de la tasa respiratoria de los tejidos lo que acelera la liberación de calor, la maduración y el adelantamiento de la senescencia. Mas aún, el daño por impacto a veces produce disrupciones en la barrera natural (cutícula) de los frutos a la pérdida de agua, con lo cual se encuentran expuestos al ataque de patógenos, en mayor magnitud cuanto más grande sea la fractura cuticular (Børve et al. 2000).

Dentro de una misma especie, la susceptibilidad al pitting puede ser diferente de acuerdo a los cultivares (por ejemplo ‘Van’ es uno de los más susceptibles) pero además se debe tener en cuenta otros factores intrínsecos del fruto como son la tasa respiratoria, la temperatura (Crisosto et al. 1993), la firmeza, la pérdida de peso y el estado de madurez (Toivonen et al. 2004). Las variedades utilizadas en este trabajo se caracterizan por su textura y firmeza contrastantes, con lo cual la susceptibilidad al daño mecánico varía entre ellas y además es dable esperar que esto produzca cambios diferenciales en la composición de la pared celular.

En conclusión, si bien las cerezas representan en proporción menor producción con respecto a otras frutas, tienen un gran valor en el mercado externo y una entrada cada vez más incipiente en el mercado interno. Por esto, es primordial el conocimiento de cómo la pérdida de la firmeza de los frutos es un proceso determinante de la vida en postcosecha y es afectada por diversos factores, ya sean externos (temperatura, humedad y daños mecánicos) como internos (genotipo, susceptibilidad a los daños, etc). Asimismo, se sabe que hay una estrecha relación entre la firmeza y el ablandamiento de los frutos con la estructura de la pared celular y la dinámica de los procesos de solubilización, despolimerización y pérdida de azúcares neutros, lo cual demanda estudios para entender estos procesos y aprovecharlos en pos de una mejor conservación de la fruta.

A continuación se presentan los objetivos, general y específicos, y sus correspondientes hipótesis.

1.6 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

16.1 Objetivos

Para el experimento “Cambios durante el crecimiento y maduración de los frutos: relación entre la pérdida de firmeza y la estructura de la pared celular”, desarrollado en el capítulo 2, los objetivos son los siguientes:

Objetivo general

El objetivo de este trabajo es aportar conocimiento acerca de los cambios que se producen en la pared celular durante la ontogenia de cerezas dulces (*Prunus avium* L.) con firmeza contrastante.

Objetivo específico

Caracterizar y comparar la composición, el proceso de solubilización y despolimerización de la pared celular de los frutos de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) durante el crecimiento y maduración en dos cultivares de firmeza contrastantes.

Para el experimento “Efecto de los daños mecánicos producidos en cerezas dulces (*Prunus avium* L.) sobre la composición de la pared celular de los frutos”, desarrollado en el capítulo 3, el objetivo es el siguiente:

Objetivo general

Evaluar los efectos potenciales del daño mecánico por impacto en postcosecha, sobre la constitución de la pared celular de los frutos firmes (cv Sweetheart) y blandos (cv. Newstar) de cerezo dulce.

Objetivo específico

Caracterizar y comparar la composición, el proceso de solubilización y despolimerización de la pared celular de los frutos de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) dañados mecánicamente, en dos cultivares de firmeza contrastantes.

1.6.2 Hipótesis de trabajo

A fin de cumplimentar el objetivo específico del experimento del capítulo 2, se pusieron a prueba las siguientes hipótesis:

- A. El estado ontogénico del fruto determina modificaciones sustantivas en la constitución de la pared celular de cerezas dulces de características contrastantes.
- B. Los cambios en la pared celular de las cerezas dulces se asociarían en primer término a una despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes, unidos más o menos estrechamente a la celulosa. Este proceso ocurriría a través de casi toda la ontogenia del fruto.

- C. Durante la adquisición de textura fundente, el ablandamiento de las cerezas dulces se vincularía además con la pérdida de azúcares neutros de pectinas y glicanos entrecruzantes.

A fin de cumplimentar el objetivo específico del experimento del capítulo 3, se puso a prueba la siguiente hipótesis:

- A. El daño mecánico en cerezas dulces induce modificaciones en los polisacáridos de la pared celular de la zona afectada de forma diferencial según la firmeza de la variedad.

CAPITULO 2

CAMBIOS DURANTE EL CRECIMIENTO Y MADURACIÓN DE LAS CEREZAS DULCES: RELACIÓN ENTRE LA PÉRDIDA DE FIRMEZA Y LA ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR.

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Las investigaciones sobre pared celular de cerezas

Entre los ocho objetivos principales del mejoramiento del cerezo a nivel mundial se encuentra la obtención de frutos firmes y con buenas cualidades para la comercialización a ultramar (Srinivasan et al. 2005). Esto ha llevado a ahondar en el tema y sobre todo a centrar los esfuerzos en comprender qué cambios ocurren en la pared celular ante diferentes condiciones (ontogenia, estrés biótico o abiótico) no sólo en cerezas sino también en otros frutos.

Se ha observado que el ablandamiento de los frutos está ligado al genotipo y en consecuencia al nivel de síntesis de pared celular, encontrándose genotipos de fruta firme que sintetizan materiales de pared hasta estadíos más tardíos en comparación con genotipos de frutos blandos (Choi et al. 2002a). A nivel ultraestructural, existirían diferencias entre células de frutos de textura blanda y de textura crujiente (Batisse et al. 1996a). A madurez, en frutos blandos la laminilla media está mejor preservada, la pared primaria es delgada y muestra bolsas de degradación delimitadas por formaciones de membrana residuales. En cambio los frutos firmes presentan solubilización de la laminilla media y una gran reestructuración de la pared primaria, resultando en la separación entre células.

En los primeros estudios de caracterización de las pectinas de cerezas, se asoció el ablandamiento con un incremento en las pectinas totales por fruto. A medida que el fruto se ablanda y se incrementa el contenido de pectinas totales, la solubilidad de las mismas también aumenta (Fils-Lycaon y Buret 1990). Hasta ahora se sabe que la aplicación de ácido giberélico en precosecha puede demorar el ablandamiento de cerezas, al tiempo que disminuye el contenido de pectinas solubles en agua en los frutos tratados (Facteau 1982a; Kondo y Danjo 2001). A partir de investigaciones desarrolladas utilizando cerezas ‘Satohnishiki’, Kondo y Danjo (2001) sugirieron que el ablandamiento puede ser causado por una degradación de la pectina, con posterior disolución de los azúcares neutros unidos al esqueleto del ramnogalacturonano, y no por una disolución de homogalacturonanos solamente. En cerezas ‘Bigarreau Burlat’ se ha comparado el grado de polimerización de la pared celular de frutos blandos con el de frutos crujientes observándose que las de los frutos más blandos tienen un menor grado de polimerización. Esto significa que esos polímeros presentan una menor interacción con otros polímeros de pared y en consecuencia las células aparecen con formas irregulares (Batisse et al. 1996b).

Por otro lado, Batisse et al. (1994) demostraron que durante la maduración de las cerezas, el ablandamiento no depende de la despolimerización de pectinas ni de la acción de la enzima endo-poligalacturonasa (endo-PG). Los estudios de ciertas

glicosidasas, como la β -galactosidasa, sugieren una relación con la pérdida de azúcares neutros (Andrews y Li 1994, 1995). Algunas enzimas como la pectinmetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG) en conjunto con β -galactosidasa (Barret y Gonzalez 1994), también parecen intervenir en el ablandamiento de las cerezas. Otra glicosidasa, la β -glucosidasa, probó ser capaz de liberar glucosa libre de las paredes celulares de las cerezas, además de ser activa frente a una amplia gama de sustratos de síntesis como la prunasina (Gerardi et al. 2001). Esta enzima, que podría estar relacionada con el cADN de una β -glucosidasa informado con anterioridad (Wiersma y Fils-Lycaon 1996), se localiza en el citosol y apoplasto de frutos inmaduros, pero se asocia con las paredes celulares en frutos maduros (Gerardi et al. 2001). Esto sugiere que podría desempeñar un papel en la pérdida de glucosa que acompaña el ablandamiento de las cerezas (Kondo y Danjo 2001), aunque las pérdidas de galactosa y de arabinosa de las paredes celulares superen las de glucosa.

Por lo tanto, el objetivo de esta sección de la tesis es caracterizar y comparar la composición, el proceso de solubilización y despolimerización de la pared celular de los frutos de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) durante el crecimiento y maduración en dos cultivares de firmeza contrastantes. Para ello, se pusieron a prueba las siguientes hipótesis, que establecen que 1) el estado ontogénico del fruto determina modificaciones sustantivas en la constitución de la pared celular de cerezas dulces de características contrastantes; 2) Los cambios en la pared celular de las cerezas dulces se asociarían en primer término a una despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes, unidos más o menos estrechamente a la celulosa. Este proceso ocurriría a través de casi toda la ontogenia del fruto 3) Durante la adquisición de textura fundente, el ablandamiento de las cerezas dulces se vincularía además con la pérdida de azúcares neutros de pectinas y glicanos entrecruzantes.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Se recolectaron cerezas (*Prunus avium* cv. Sweetheart y Newstar) de árboles plantados en un monte comercial ubicado en la zona del Alto Valle de la provincia de Río Negro. Se cosecharon aproximadamente 1 vez por semana 3 repeticiones de 45 frutos de cada variedad para la medición de firmeza, porcentaje de sólidos solubles y peso. Las muestras fueron tomadas al azar y de la zona media de cada árbol, descartando aquellos frutos defectuosos o dañados. De las cosechas se eligieron 4 estadios característicos de la curva de crecimiento de frutos de carozo, y se tomaron 15 frutos para el análisis de pared celular. Los estadios son los siguientes:

- I: de crecimiento exponencial por multiplicación celular; ‘Sweetheart’ a los 31 días después de plena floración (ddpf) y ‘Newstar’ a los 28 ddpf.
- II: esclerificación del endocarpo; ‘Sweetheart’: a los 54 ddpf y ‘Newstar’ a los 36 ddpf.
- III: crecimiento lineal por agrandamiento celular; ‘Sweetheart’ a los 62 ddpf y ‘Newstar’ a los 44 ddpf.
- IV: fruto maduro; ‘Sweetheart’ a los 75 ddpf y ‘Newstar’ a los 59 ddpf.

Las dos variedades tienen distintos momentos de maduración, la primera es de maduración temprana y la segunda tardía, por ende el momento de cosecha debía ser diferente para representar los distintos puntos en la curva de crecimiento (peso fresco).

2.2.2 Índices fisiológicos, índices de madurez y calidad durante ontogenia.

En cada uno de los estadios mencionados en 2.2.1 se realizaron las siguientes mediciones:

2.2.2.1 Contenido de sólidos solubles

Se efectuaron mediciones de sólidos solubles del jugo con un refractómetro de mano auto compensado (Atago) tomando 3 repeticiones de 5 frutos por variedad. Los resultados se expresan en porcentaje (%) o °Brix.

2.2.2.2 Peso y diámetro ecuatorial

Se tomaron 8 frutos por repetición, sin pedúnculo y se determinó individualmente con balanza electrónica el peso (g) y el diámetro mayor (mm) en el lado opuesto de la sutura, en el radio ecuatorial con un calibre electrónico.

2.2.2.3 Firmeza

La firmeza se determinó individualmente sobre el radio ecuatorial sobre los mismos frutos que fueron utilizados para la medición de peso y diámetro ecuatorial) en los lados opuestos a la sutura en el radio ecuatorial donde se ubica el diámetro mayor, sin remover la piel, midiendo la fuerza requerida para deformarlo hasta 2 mm y utilizando el equipo Instron Universal Testing Machine (modelo 3342, Canton, MA, USA). Cada fruto fue ubicado entre placas de acero y deformado con una velocidad de cruceta de 20 mm min⁻¹. La firmeza se expresó en Newton.

2.2.3 Extracción, fraccionamiento y análisis de la pared celular

De las muestras obtenidas en cada estadio se retiró el pedúnculo y el endocarpo usando un escalpelo y el resto de los tejidos fueron inmediatamente congelados a -18°C y almacenados hasta su análisis.

2.2.3.1 Metodología de extracción de la pared celular.

La preparación y el fraccionamiento de la pared celular se efectuó de acuerdo con protocolos previos, detallados por Sozzi et al. (2002) y Brummell et al. (2004) con algunas modificaciones. En este caso no se utilizó el buffer TRIS fenol ya que utilizando la muestra freezeada y expuesta al etanol a baja temperatura se puede evitar la degradación enzimática sobre la pared celular.

Se licuaron 20 g de material fresco con 80 ml de etanol frío al 80%, y luego se homogeneizó en un Omnimixer. El homogenato fue inmediatamente hervido por 30 minutos y luego se enfrió y filtró a través de un papel de filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C). El material insoluble retenido se lavó con abundante etanol 95 %. El sólido fue resuspendido en 60 ml cloroformo:metanol (1:1) agitándolo durante 15 minutos y posteriormente filtrado. El material retenido se lavó con 40 ml de la misma mezcla de solventes. El material insoluble se lavó con acetona hasta su decoloración, obteniendo el extracto crudo de pared celular (residuo insoluble en alcohol, AIR). El

AIR fue secado al aire bajo campana y luego en un desecador al vacío por la noche, para finalmente ser pesado.

2.2.3.2. Fraccionamiento de polisacáridos de la pared celular

El fraccionamiento de pared celular se realizó según describieron previamente Ponce et al. (2010) y Sozzi et al. (2002) con algunas modificaciones. Brevemente, se tomaron 3 g de material y se agitaron con 300 ml de solución acuosa conteniendo 0,02 % [p/v] de timerosal por 24 h. El sobrenadante, designado **fracción soluble en agua** fue removido. La extracción secuencial del pellet con CDTA 0.05M en buffer NaOAc/HOAc 0.05M, pH 6, conteniendo 0.02% (p/v) de timerosal (24 h), Na₂CO₃ 0.1M en NaBH₄ 0.1 mM (24 h), KOH 4% en 0.1% (p/v) NaBH₄ (24 h), y KOH 24% en 0.1% (p/v) NaBH₄ (24 h), produjeron la fracción soluble en CDTA, la fracción soluble en Na₂CO₃, y las fracciones solubles en KOH 4 y 24%, respectivamente. Los sobrenadantes fueron recuperados después de centrifugación a 9000g. En el caso de las extracciones con KOH, el pH se ajustó previamente a 5 con ácido acético glacial. Todas las fracciones fueron dializadas (utilizando membrana de corte de peso molecular 6000-8000) exhaustivamente contra agua corriente por 2 días y luego contra agua destilada por un día a 4°C. Las fracciones fueron recuperadas por liofilización y posteriormente pesadas.

2.2.3.3 Análisis químicos

2.2.3.3.1 Métodos colorimétricos

El contenido de ácidos urónicos se determinó siguiendo la modificación de Filisetti-Cozzi y Carpita (1991) del método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973) usando ácido galacturónico como estándar y los datos fueron expresados en unidades anhidro. Los azúcares neutros fueron determinados mediante el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al. 1956), con glucosa como estándar. Para las determinaciones colorimétricas se utilizó un espectrofotómetro Spectronic 29 D (Milton Roy) utilizando celdas cilíndricas de 1 cm de camino óptico.

En todos los casos se utilizaron 2 mg de fracción pesados exactamente. Para la fracción acuosa se utilizó una solución de la misma en 5 ml de agua destilada. Para las fracciones de CDTA, Na₂CO₃, KOH 4% y KOH 24%, el producto se trató según la técnica de Ahmed y Labavitch (1980) para producir una solubilización completa del material:

1. Se trataron las fracciones con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado en un baño de hielo y se agitaron por 10 minutos.
2. Luego se agregaron gota a gota 0,5 ml de agua destilada completando hasta 2 ml, siempre en baño de hielo y se dejó agitando por 1 hora.
3. Una vez solubilizadas las muestras, se transfirieron a matraces de 5 ml y se enrasó con agua destilada, para obtener así las alícuotas utilizadas en las mediciones.

Procedimiento de los ensayos colorimétricos

a) Ácidos urónicos:

Se tomaron soluciones de 100, 200 y 300 µl, las cuales se llevaron a 400 µl con agua destilada. En otro tubo de ensayo se preparó el blanco con 400 µl de agua destilada. La curva estándar se obtuvo con una solución de ácido D-

galacturónico (0,18mg/ml), de la cual se tomaron soluciones de 50, 100, 200, 300 y 400 µl que eventualmente se llevaron a 400 µl con agua destilada.

- I. Se agregó a cada tubo de ensayo 40 µl de *solución A* y se agitó. Luego se adicionaron 2,4 ml de *solución B* a cada tubo de ensayo y se volvió a agitar. Los tubos se colocaron en un baño de agua hirviendo, tapados en su extremo para evitar la evaporación de las muestras por 20 minutos y luego se enfriaron sumergiéndolos en un baño de hielo por 10 minutos. Se agregó a cada tubo 80 µl de la *solución C* y se agitó. En un período de tiempo de entre 10 minutos y 1 hora, se leyó la absorbancia a 525 nm del blanco, las muestras y curva estándar.

Reactivos:

- *Solución A*: ácido sulfámico/ sulfamato de potasio 4 M (pH 1,6). Colocar en envase oscuro.
- *Solución B*: Tetraborato de sodio 75 mM en ácido sulfúrico concentrado grado analítico.
- *Solución C*: *m*-hidroxidifenilo (0,15 %) en hidróxido de sodio acuoso al 0,5%.

b) Azúcares totales (método del fenol-ácido sulfúrico)

Se tomaron soluciones de cada muestra de 50, 100 y 150 µl, las cuales se llevaron a 500 µl con agua destilada. En otro tubo de ensayo se preparó el blanco con 500 µl de agua destilada. La curva estándar se efectuó con glucosa (0.1mg/ml). Se tomaron soluciones de 50, 100, 150, 200, 250 y 300 µl y se llevaron a 500 µl con agua destilada.

Se agregaron a cada tubo de ensayo 0,5 ml de fenol al 5% y se agitó en vortex. Una vez mezclados, se adicionaron 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar un calentamiento máximo a cada tubo de ensayo y se agitó cuidadosamente. Se dejó enfriar y se leyeron en espectrofotómetro las absorbancias a 490 nm tanto del blanco, como las muestras y curva estándar.

Reactivos:

- *Solución de fenol al 5 % (p/v)*. Esta solución es estable a temperatura ambiente durante varios meses conservada en frascos de color caramelo
- *Acido sulfúrico 98% grado analítico*.

De la curva estándar de cada método se utiliza la pendiente y luego se incorporan los datos a la siguiente ecuación para el cálculo del contenido de ácidos urónicos o azúcares totales:

$$\% \text{ componente} = \frac{\frac{\text{absorb/pendiente} \times 5\text{ml}}{\text{ml alícuota}} \times 100}{\text{peso fracción } (\mu\text{g})}$$

Posteriormente se calculó el valor anhidro para cada uno de los datos (multiplicando por (PM-18)/PM).

2.2.3.3.2 Métodos cromatográficos

a) Determinación de azúcares neutros componentes por conversión a acetatos de alditoles (Blakeney et al 1983).

Se realizó analizando por cromatografía gaseosa los derivados de los monosacáridos provenientes de la hidrólisis de los polisacáridos.

• Procedimiento: **Hidrólisis ácida**

- I. Se pesaron muestras de aproximadamente 4 mg en viales provistos con cierre de teflón y se adicionó una solución de 1 ml de TFA (ácido trifluoroacético) 2 M conteniendo 3 mg de *myo*-inositol, dejando proceder la hidrólisis en estufa a 121°C durante 90 minutos. Los viales se dejaron enfriar, y se colocaron bajo campana hasta evaporar el ácido completamente bajo corriente de aire.
- II. Posteriormente los hidrolizados fueron redisoluertos en agua y nuevamente evaporados. Este tratamiento se realizó las veces necesarias hasta eliminar totalmente el ácido (reconocible por el olor). Las muestras fueron colocadas en un desecador al vacío durante una noche.

Preparación de los alditoles peracetilados

- III. A las muestras secas (provenientes de las hidrólisis) contenidas en los viales se les agregaron 0,5 ml de hidróxido de amonio 1M y se redujeron con 5 mg de borohidruro de sodio. Se mezcló a temperatura ambiente dejando los viales durante toda la noche destapados para permitir la evolución de hidrógeno.
- IV. Se adicionó a cada vial unas gotas de ácido acético diluido para destruir el exceso de agente reductor, hasta cese de la efervescencia y se descationizó agregando resina Amberlite IR-120 (H+). Se filtró y llevó a seco evaporando con aire.
- V. El ácido bórico se eliminó como borato de metilo, mediante 5 agregados sucesivos de 0,5 ml de metanol a cada vial y luego se evaporó con aire a seco en cada oportunidad. Se guardaron los viales durante la noche en desecador al vacío.
- VI. Acetilación: A cada vial se le agregó 1 ml de una mezcla de anhídrido acético: piridina en relación 1:1. Se llevaron los viales tapados a estufa por 45 minutos a 100°C.
- VII. Una vez fríos, se pasó el contenido de los viales a tubos de ensayo. Se extrajo con 1.5 ml de cloroformo-agua (1:1). La fase acuosa se recuperó y se extrajo nuevamente con una mezcla de iguales características.
- VIII. Los extractos clorofórmicos recuperados se lavaron 3 veces con 1 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio y dos veces con 1 ml de agua destilada.
- IX. Finalmente los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporaron a sequedad.

- X. El residuo obtenido se disolvió en 20 μ l de cloroformo inmediatamente antes de ser inyectado en el cromatógrafo gaseoso.

Las cromatografías gas-líquido se realizaron en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP3395. Se utilizó nitrógeno como gas portador y las corridas se efectuaron con una relación de split 80:1. Se utilizó una columna capilar SP-2330 (Supelco), de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 μ m de espesor de la fase líquida.

El flujo del gas portador fue de 1 ml/min y la presión en cabeza de columna fue de 15 Psi (= 1,02 atm). Se realizó una corrida isotérmica a 220°C y las temperaturas del inyector y detector fueron de 240°C.

Se utilizó *myo*-inositol como estándar interno, y los diferentes acetatos de alditoles fueron identificados por comparación con estándares. El porcentaje de los diferentes monosacáridos se calculó considerando que las respuestas FID son proporcionales al peso molecular de los acetatos de alditoles.

b) Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Determinación de depolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes

Se pesaron 3 mg de cada fracción y se solubilizaron en el solvente adecuado (ver luego) con agitación magnética durante toda la noche. Se utilizó una columna de exclusión por tamaño (SEC) de baja presión con bomba y colector a una tasa de 0,7 ml/min.

Las muestras de CDTA y Na₂CO₃ fueron disueltas en 0.8 ml de imidazol (0.4mg/ml). Tras agitar toda la noche, se le adicionaron 0.2ml de NH₄AcO 1M (pH 5). Las soluciones fueron centrifugadas y el sobrenadante se sembró en una columna de Sepharose CL-2B de 300mm x 9mm d.i. (Sigma Chemical Co., Saint Louis, Missouri) eluyendo a temperatura ambiente con NH₄AcO 0.2M, pH 5 (Brummell et al. 2004).

Las muestras de la fracciones acuosa, KOH 4 y 24% fueron disueltas en 1 ml de NaOH 0.1M, y tras centrifugación fueron cromatografiadas por SEC de baja presión por medio de una columna de Sepharose CL-6B de 300mm x 9mm d.i. (Sigma Chemical Co.), eluyendo a temperatura ambiente con 0.1M NaOH. Las fracciones fueron colectadas y las alícuotas fueron analizadas para carbohidratos totales debido a que en experiencias previas (Ponce et al. 2010) los perfiles de ácidos urónicos y carbohidratos totales fueron similares en consecuencia sólo se llevó a cabo la metodología para carbohidratos totales de cada fracción.

2.2.4 Análisis estadístico

Los resultados de firmeza, peso, diámetro ecuatorial, sólidos solubles, ácidos urónicos y azúcares neutros fueron analizados mediante ANOVA. La homogeneidad de varianza y normalidad fueron probadas por medio de los test de Levene y Shapiro-Wilk's respectivamente. Las comparaciones entre medias de los tratamientos se realizaron mediante el test de tukey ($P < 0.05$).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Evolución del peso, firmeza y porcentaje de sólidos solubles de los frutos durante ontogenia.

La curva de crecimiento de los frutos de carozo presenta una forma doble sigmoidea con tres estadios visibles de crecimiento. Esto es lo que se observa en este caso en cerezas (Figura 2.1 A y B), el estadio I es de activa división celular y aumento de peso del fruto luego de floración y polinización, el estadio II es la fase lag o de lignificación del endocarpo, desarrollo del embrión y reducida tasa de crecimiento del fruto, y finalmente el estadio III es el de expansión celular y rápido incremento del tamaño del fruto y maduración. Generalmente, para las variedades tempranas (Newstar) no suele observarse el estadio II (Fig. 2.1A), debido al breve período en que se produce el endurecimiento del endocarpo y la maduración del fruto. En este trabajo se considera el estadio IV o de madurez, en el cual el fruto alcanza en el árbol las características organolépticas para cosecha y consumo.

El peso final promedio del fruto de la variedad Sweetheart (Fig. 2.1B) fue mayor que el de la variedad Newstar (8,8 g vs. 7,2 g respectivamente) teniendo en cuenta que la primera tiene un tiempo de maduración mucho más largo con una diferencia de casi dos semanas, resultando en una variedad de maduración tardía.

El diámetro ecuatorial (Fig. 2.1C y D) mostró un patrón similar a la curva de crecimiento en ambas variedades, verificándose además que sólo ‘Sweetheart’ presentó una etapa II bien marcada ya que se detuvo el incremento en diámetro, y también logró llegar a un diámetro significativamente mayor que ‘Newstar’ pero en un lapso de tiempo más prolongado.

Los sólidos solubles de la variedad Sweetheart (Fig. 2.1F), aumentaron desde el estadio I, disminuyeron levemente cuando el fruto entró en el estadio II (donde no se observa un aumento significativo del peso) y luego volvieron a aumentar hacia el estadio IV de madurez comercial, para finalmente disminuir levemente cuando el fruto estaba sobremaduro. Al mismo tiempo, la firmeza medida como la fuerza de deformación que se ejerce sobre el fruto (Fig. 2.1H), siguió un patrón diferente debido a que el fruto en el estadio I poseía un elevado nivel de firmeza, mayor a 8 N, y luego cayó abruptamente a alrededor de 1,35 N cuando el fruto estaba sobremaduro.

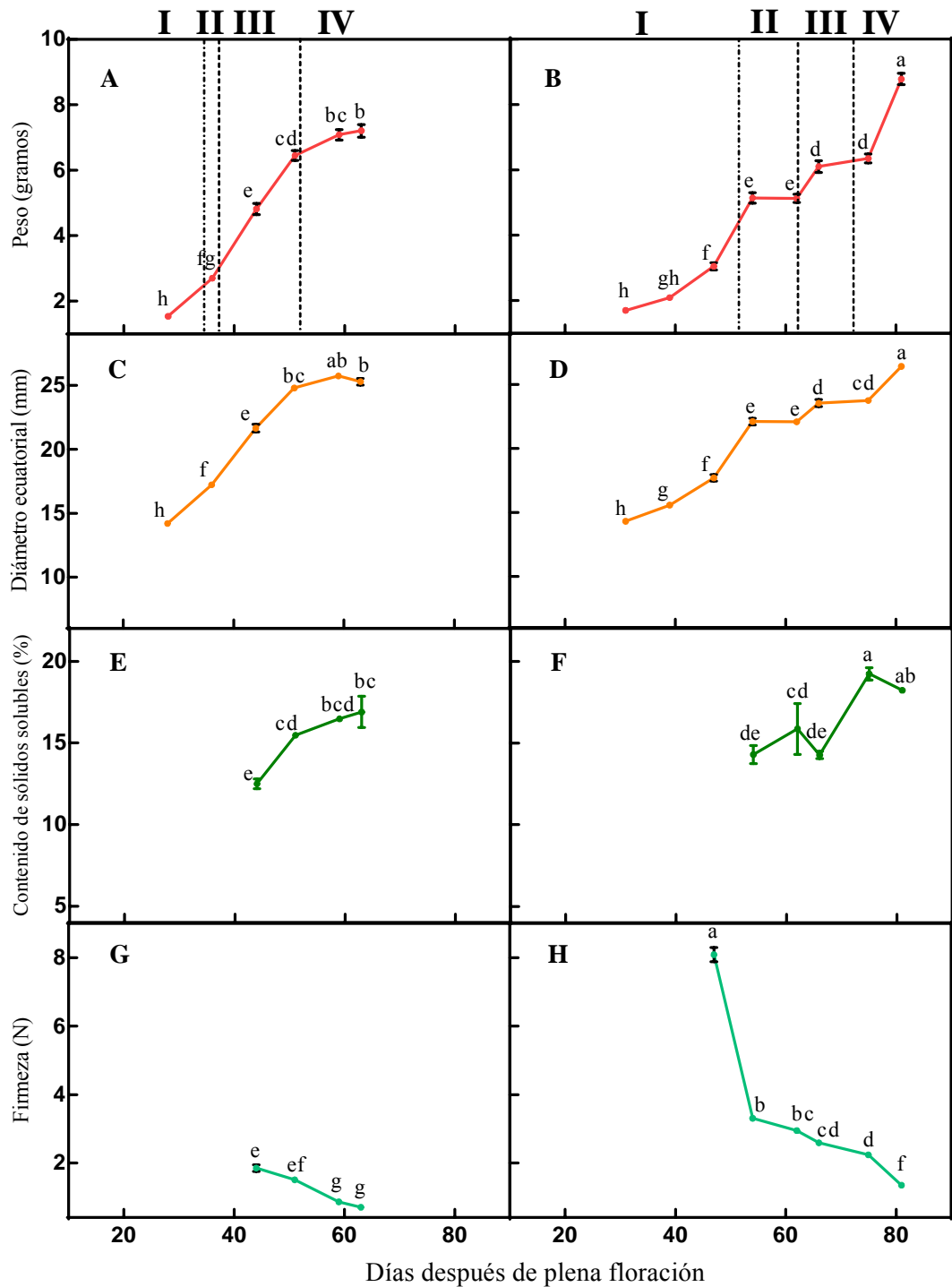


Figura 2.1 Curva de crecimiento (peso expresado en gramos), diámetro ecuatorial (mm), contenido de sólidos solubles (%) y firmeza (N) de frutos de las variedades Newstar (A, C, E y G) y Sweetheart (B, D, F y H) desde cuaje hasta madurez (días después de plena floración). Los valores representan las medias y las barras verticales indican error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre fechas y variedades ($p < 0.05$)

Por otra parte la variedad Newstar se caracterizó por tener frutos blandos (Fig. 2.1G) desde el inicio del estudio en el estadio I (inmaduros), presentando una firmeza de 2,08 N, la cual disminuyó significativamente a medida que el fruto maduraba, a valores

no comercializables. Los sólidos solubles en esta variedad (Fig. 2.1E) presentaron un aumento de sólo 4,3 % entre los estadios I y IV.

La firmeza de los frutos cosechados a los 44 ddpf ('Newstar') y 54ddpf ('Sweetheart') era muy elevada como para ser medida con el penetrómetro disponible. De forma similar, la extracción de jugo para la medición de sólidos solubles no se hizo en los primeros días de crecimiento porque no era posible extraer suficiente jugo para realizar la medición.

2.3.2 Extracción secuencial de la pared celular.

El residuo insoluble en alcohol (AIR) consiste principalmente en la pared celular proveniente del epi- y mesocarpo de cerezas en cada uno de los 4 estadios ya descriptos. Analizando la evolución del contenido de AIR (cuadro 2.1), se observó que desde el estadio I hacia el IV el contenido disminuyó entre 63 y 66 % tanto en 'Sweetheart' como en 'Newstar', registrándose la mayor disminución al pasar del estadio II al III, coincidente con la etapa de crecimiento exponencial del fruto.

Cuadro 2.1 Rendimiento del residuo insoluble en alcohol cada 100g de peso fresco de frutos blandos (Newstar) y firmes (Sweetheart) durante ontogenia (estadios I a IV)

Estadio	Rendimiento AIR (g/100 g PF)	
	Sweetheart	Newstar
I	4,78 (81,2)	4,59 (70,7)
II	3,54 (73,9)	3,28 (88,6)
III	1,85 (94,7)	1,75 (84,1)
IV	1,77 (112,2)	1,53 (108,6)

Los valores entre paréntesis indican rendimiento de AIR en mg/fruto

Los frutos firmes 'Sweetheart', mostraron un contenido levemente mayor de AIR que los blandos 'Newstar'. En cambio, expresando el rendimiento de AIR por peso promedio del fruto se observó que no disminuyó durante ontogenia (Cuadro 2.1), sino más bien hubo un leve aumento del contenido de AIR

El AIR de las dos variedades de cerezas fue fraccionado por extracciones sucesivas con H₂O (fracción H₂O), CDTA (fracción CDTA), Na₂CO₃ (fracción Na₂CO₃), KOH 4% (fracción KOH4%) y KOH 24% (fracción KOH24%), a partir de los que se obtuvieron pectinas débilmente unidas (solubles en agua), pectinas unidas iónicamente (solubles en agente quelante de Ca y Mg), pectinas unidas covalentemente (solubles en carbonato), fracciones ricas en glicanos entrecruzantes débil y fuertemente unidas respectivamente.

En la variedad Sweetheart caracterizada por tener frutos firmes, los rendimientos de las fracciones pécticas (Cuadro 2.2) mostraron un comportamiento variable, siendo las pectinas solubles en H₂O las que presentaron una disminución en el estadio II, para luego incrementarse levemente hacia el estadio IV. Contrariamente, las pectinas en CDTA aumentaron hasta el estadio II y luego disminuyeron hacia el estadio IV. A diferencia de las primeras fracciones, el contenido de la fracción solubilizada en Na₂CO₃ disminuyó levemente hacia el estadio III pero en gran magnitud en el estadio IV.

Cuadro 2.2 Fracciones extraídas de cerezas ‘Sweetheart’ a través de los distintos estadios de crecimiento (I-IV) expresadas en g/100g AIR.

Estadio	Fracciones				
	H ₂ O	CDTA	Na ₂ CO ₃	KOH 4%	KOH 24%
I	6,18	9,17	29,34	9,61	6,74
II	3,64	13,78	28,40	9,31	11,31
III	8,26	10,70	24,20	16,49	7,03
IV	9,99	11,28	10,09	5,93	5,35

El contenido de la fracción KOH 4% (correspondiente a glicanos entrecruzantes, es decir hemicelulosas unidas débilmente) registró un aumento importante hacia el estadio III de máximo crecimiento exponencial del fruto y luego un marcado descenso en madurez. En cambio, la proporción de glicanos entrecruzantes unidos fuertemente (fracción KOH 24%) aumentó hacia el estadio II de endurecimiento del endocarpo y luego disminuyó hacia el estadio IV.

En cerezas ‘Newstar’ (cuadro 2.3) el rendimiento de la fracción acuosa (pectinas solubles) se incrementó continuamente, pero a partir del estadio III hacia madurez lo hizo en mayor proporción que ‘Sweetheart’, mientras que la fracción CDTA de pectinas iónicamente unidas aumentó hacia el estadio II, disminuyó en el estadio III de rápida expansión celular y volvió a aumentar en el estadio IV de madurez. El rendimiento de la fracción Na₂CO₃ disminuyó hacia madurez pero no tan abruptamente en el último estadio como ocurrió en ‘Sweetheart’.

En las fracciones ricas en glicanos entrecruzantes, aquellas débilmente unidas (KOH 4%) se incrementaron hacia madurez mientras que las fuertemente unidas (KOH 24%) no registraron cambios durante ontogenia.

Cuadro 2.3 Fracciones extraídas de cerezas Newstar en los distintos estadios de crecimiento (I-IV) expresadas en g / 100 g AIR

Estadio	Fracciones				
	H ₂ O	CDTA	Na ₂ CO ₃	KOH 4%	KOH 24%
I	4,57	10,87	28,75	9,16	7,15
II	4,95	13,25	27,03	11,42	7,01
III	9,62	11,52	25,24	13,51	7,06
IV	12,10	14,55	21,31	15,99	6,99

2.3.3 Cambios en el contenido de ácidos urónicos y azúcares neutros de la pared celular de cerezas firmes y blandas durante ontogenia.

2.3.3.1 ‘Sweetheart’

En esta variedad de frutos firmes, la proporción de ácidos urónicos por fracción (Cuadro 2.4) disminuyó significativamente hacia el estadio IV en las fracciones H₂O y KOH 24% (50% y 81% respectivamente). En cambio en las fracciones pécticas CDTA y Na₂CO₃ se observaron aumentos leves en la proporción de ácidos urónicos. La única fracción en la que no se observó variaciones fue KOH 4%. En los estadios intermedios se observaron variaciones en las fracciones pécticas, tal es así que en el estadio II hay

un aumento del contenido de urónicos en la fracción CDTA produciéndose al mismo tiempo que disminuye el contenido de urónicos en las fracciones H₂O y Na₂CO₃. En cambio en el estadio III (de elongación celular) disminuye el contenido de urónicos en las fracciones CDTA y Na₂CO₃ al mismo tiempo que aumenta en la fracción H₂O.

Si se analiza el contenido de ácidos urónicos en función del AIR obtenido (Cuadro 2.4), se observa que las variaciones en las fracciones son coincidentes en muchos casos con el rendimiento de AIR (Cuadro 2.2), como es de esperar. En consecuencia, en el estadio II de la fracción acuosa hay una gran disminución de ácidos urónicos relacionada al bajo rendimiento de la fracción, pero aunque luego aumente el rendimiento, de todas formas disminuye el contenido de ácidos urónicos hacia el estadio IV por la ya mencionada disminución de la proporción de ese componente. De forma inversa, en la fracción CDTA el contenido de ácidos urónicos aumentó significativamente hacia el estadio II, luego disminuyó y volvió a aumentar en el estadio IV.

Como era de esperar debido al mayor rendimiento obtenido de la fracción Na₂CO₃ (Cuadro 2.2) y además considerando que es una fracción péctica, ésta fue la más rica en ácidos urónicos de todas las fracciones. Sin embargo, el alto contenido inicial de ácidos urónicos fue disminuyendo, produciéndose una pérdida de aproximadamente el 60% hacia madurez.

En el estadio II se puede observar que el contenido de ácidos urónicos aumentó en la fracción CDTA mientras que disminuyó en las fracciones H₂O y Na₂CO₃. Sin embargo, a continuación en el estadio III aumentó el contenido de urónicos solubles en la fracción H₂O mientras que disminuyó en las fracciones CDTA y Na₂CO₃. Por último, a madurez ocurre la misma situación que en el estadio II, aumentando el contenido de urónicos en la fracción CDTA y disminuyendo en las fracciones H₂O y Na₂CO₃.

Cuadro 2.4. Contenido de ácidos urónicos en porcentaje (%) y en miligramos por gramo de AIR en las fracciones de pared celular de cerezas 'Sweetheart' durante diferentes estadios (I-IV) de su ontogenia^a.

Contenido de ácidos urónicos (%)									
Fracción	Estadios								
	I			II			III		
H ₂ O	52,0 ±	1,7	c	25,9 ±	0,9	a	37,5 ±	1,7	b
CDTA	77,6 ±	0,4	b	88,5 ±	0,6	c	69,3 ±	0,7	a
Na ₂ CO ₃	65,6 ±	1,7	c	58,4 ±	0,7	b	47,0 ±	1,2	a
KOH 4%	10,2 ±	0,8	a	7,7 ±	1,7	a	7,5 ±	0,8	a
KOH 24%	5,8 ±	0,4	b	5,7 ±	0,8	b	5,1 ±	0,9	b
Contenido de ácidos urónicos (mg/g AIR)									
Fracción	Estadios								
	I			II			III		
H ₂ O	32,1 ±	1,1	c	9,4 ±	0,3	a	31,0 ±	1,4	c
CDTA	71,1 ±	0,4	a	122,0 ±	0,8	d	74,2 ±	0,8	b
Na ₂ CO ₃	192,5 ±	4,9	d	165,8 ±	1,9	c	113,6 ±	3,0	b
KOH 4%	9,8 ±	0,8	bc	7,1 ±	1,6	ab	12,3 ±	1,4	c
KOH 24%	3,9 ±	0,2	b	6,4 ±	0,9	c	3,6 ±	0,6	b

^aLos valores representan las medias ± desviación estándar (n=3). Las letras indican diferencias significativas dentro de cada fracción de pared celular (fila) en los diferentes estadios (p<0,05).

Las fracciones KOH 4 % y 24 % son ricas en glicanos entrecruzantes, no obstante presentan algún contenido de ácidos urónicos. Aunque el porcentaje de urónicos de la

fracción KOH 4% no se vio modificado durante ontogenia, el rendimiento de la fracción disminuyó (Cuadro 2.2) y en consecuencia se observó una disminución del contenido total de ácidos urónicos hacia madurez. Por otro lado la fracción KOH 24% mostró el menor contenido de ácidos urónicos los cuales disminuyeron de forma significativa hacia madurez.

El contenido de azúcares neutros fue determinado en cada una de las fracciones y en los 4 estadios debido que éstos forman parte de las cadenas laterales de las estructuras pécticas y son el componente principal de los glicanos entrecruzantes. En las fracciones CDTA y KOH 4% (Cuadro 2.5) hubo una disminución del porcentaje de azúcares neutros (64% y 32% respectivamente), y una ganancia de azúcares neutros solubles en las fracciones H₂O y Na₂CO₃ y KOH 24% (18%, 20% y 23% respectivamente) desde el estadio I al IV. En los estadios intermedios II y III no parece haber cambios significativos en cuanto a cambios en el porcentaje de azúcares neutros en las fracciones pécticas como ocurrió a madurez.

Teniendo en cuenta el rendimiento obtenido de cada fracción durante ontogenia, el contenido de azúcares neutros (en mg /g de AIR) varió en muchos casos de la misma forma que el rendimiento de las fracciones, ya que las variaciones en el porcentaje de azúcares, fueron menos significativas. En el caso de la fracción H₂O en el estadio II disminuyó pero luego aumentó hacia madurez (49% del valor inicial) coincidiendo con el rendimiento obtenido. En cambio la fracción CDTA no registró cambios en el contenido de azúcares neutros durante ontogenia excepto en madurez donde hubo una pérdida significativa de los mismos (56% del valor inicial aproximadamente) producido en gran parte por el bajo porcentaje de azúcares neutros obtenidos en ese estadio.

A diferencia de CDTA, la fracción Na₂CO₃ presentó pérdidas de azúcares neutros más temprano, en el estadio III hasta madurez disminuyendo alrededor del 56% del valor inicial.

Cuadro 2.5. Contenido de azúcares neutros en miligramos por gramo de AIR y en porcentaje (%) en las fracciones de pared celular de cerezas ‘Sweetheart’ durante diferentes estadios (I-IV) de su ontogenia^a.

Contenido de azúcares neutros (%)												
Estadios												
Fracción	I			II			III			IV		
H ₂ O	35,1	±	0,6	a	42,3	±	1,1	b	45,0	±	1,8	b
CDTA	19,4	±	0,3	c	13,4	±	2,5	b	12,2	±	0,2	b
Na ₂ CO ₃	25,5	±	1,7	a	27,9	±	0,7	a	26,4	±	1,7	a
KOH 4%	39,1	±	0,8	b	36,3	±	2,4	b	26,7	±	1,1	a
KOH 24%	41,0	±	0,4	b	37,8	±	0,6	a	47,1	±	0,7	c
Contenido de azúcares neutros (mg/g AIR)												
Estadios												
Fracción	I			II			III			IV		
H ₂ O	21,7	±	0,4	b	15,4	±	0,4	a	37,1	±	1,5	c
CDTA	17,7	±	0,3	b	18,4	±	3,5	b	13,1	±	0,2	ab
Na ₂ CO ₃	74,8	±	5,0	c	79,1	±	2,0	c	63,9	±	4,0	b
KOH 4%	37,5	±	0,7	b	33,8	±	2,3	b	44,1	±	1,9	c
KOH 24%	27,7	±	0,7	a	42,8	±	0,7	c	33,1	±	0,5	b

^aLos valores representan las medias ± desvío estándar (n=3). Las letras indican diferencias significativas dentro de cada fracción de pared celular (fila) en los diferentes estadios (p<0,05).

La variación del contenido de azúcares neutros (mg/g AIR) de la fracción KOH 4% también coincidió con el rendimiento de esa fracción, observándose pérdidas hacia

madurez de alrededor del 58% del valor inicial. En KOH 24% el contenido de azúcares neutros aumentó en el estadio II, fase de lignificación del endocarpo y desarrollo del embrión, y luego disminuyó hacia madurez en coincidencia con el rendimiento de la fracción, pero el valor final fue similar al valor inicial. Nuevamente en los estadios intermedios se puede observar variaciones entre fracciones. Como ejemplo, en la fracción H₂O disminuyó el contenido de azúcares neutros mientras que simultáneamente hubo un gran aumento de los mismos en la fracción KOH 24%. No obstante, en el estadio III se dio el proceso inverso pero también aumentó el contenido en la fracción KOH 4%.

2.3.3.2 'Newstar'

En esta variedad de frutos blandos, el porcentaje (%) de ácidos urónicos disminuyó a medida que se alcanzó la madurez en todas las fracciones excepto en la fracción CDTA en la cual se mantuvieron en niveles constantes (Cuadro 2.6). Los más afectados fueron los provenientes de las fracciones H₂O, KOH 4% y 24% con pérdidas de 41%, 49% y 57%, respectivamente. En cambio en los estadios intermedios se produjeron variaciones entre las fracciones. Así es como durante el estadio II hubo un aumento de la proporción de urónicos de las fracciones CDTA y Na₂CO₃ y simultáneamente una disminución en la fracción acuosa. En cambio en el estadio III disminuyó la proporción de urónicos solubles de las fracciones H₂O, Na₂CO₃ y KOH 24% mientras en el resto de las fracciones se mantuvo constante.

Por otro lado, el contenido de ácidos urónicos expresados en miligramos por gramo de AIR obtenido, se relacionó también al rendimiento de cada fracción (Cuadro 2.3). Las fracciones KOH 24% y Na₂CO₃ presentaron pérdidas de urónicos hacia madurez de alrededor del 57% y 38% respectivamente mientras que se incrementaron en las fracciones H₂O y CDTA. La única fracción que no presentó variaciones fue KOH 4%, ya que el aumento en rendimiento de la fracción se compensó con la menor proporción de ácidos urónicos.

En los estadios intermedios acontecieron variaciones del contenido de urónicos entre fracciones. Es así como en el estadio II aumentó el contenido de urónicos de la fracción CDTA (relacionado al rendimiento de la fracción) y disminuyó en las fracciones H₂O y KOH 24%. En el estadio III se observó lo contrario, disminuyendo el contenido de urónicos en las fracciones CDTA y Na₂CO₃ y aumentando en la fracción H₂O.

Cuadro 2.6. Contenido de ácidos urónicos en mg/g de AIR y en porcentaje (%) en las fracciones de pared celular de cerezas 'Newstar' durante diferentes estadios de su ontogenia^a.

Contenido de ácidos urónicos (%)												
Fracción	Estadios											
	I			II			III			IV		
H ₂ O	41,2 ±	1,8	c	33,3 ±	0,9	b	25,4 ±	0,3	a	24,3 ±	1,1	a
CDTA	77,4 ±	0,3	a	87,4 ±	0,9	b	86,8 ±	1,5	b	77,1 ±	1,0	a
Na ₂ CO ₃	59,7 ±	0,1	c	63,8 ±	1,0	d	53,8 ±	0,9	b	49,8 ±	2,0	a
KOH 4%	9,3 ±	1,7	b	5,7 ±	1,0	ab	5,9 ±	1,0	ab	4,7 ±	1,9	a
KOH 24%	7,3 ±	0,2	b	2,6 ±	1,8	ab	3,7 ±	1,6	a	3,1 ±	1,3	a

Contenido de ácidos urónicos (mg/g AIR)												
Fracción	Estadios											
	I			II			III			IV		
H ₂ O	18,8 ±	0,8	b	16,5 ±	0,5	a	24,4 ±	0,3	c	29,4 ±	1,3	d
CDTA	84,1 ±	0,3	a	115,8 ±	1,1	d	99,9 ±	1,7	b	112,2 ±	1,4	c
Na ₂ CO ₃	171,6 ±	0,3	c	172,5 ±	2,6	c	135,9 ±	2,4	b	106,2 ±	4,3	a
KOH 4%	8,5 ±	1,6	a	6,5 ±	1,2	a	8,0 ±	1,4	a	7,4 ±	3,1	a
KOH 24%	5,2 ±	0,1	b	1,8 ±	1,2	a	2,6 ±	1,1	a	2,2 ±	0,9	a

^aLos valores representan las medias ± desvío estándar (n=3). Las letras indican diferencias significativas dentro de cada fracción de pared celular (fila) en los diferentes estadios (p<0,05).

Analizando el contenido de azúcares neutros se observó que la proporción de estos mismos no varió significativamente hacia madurez en las fracciones CDTA y KOH 4%. Sin embargo, aumentó la proporción en las fracciones H₂O, Na₂CO₃ y KOH 24% (21%, 24% y 99% del valor inicial respectivamente). Por otro lado, en los estadios intermedios se observaron algunas variaciones como la disminución de la proporción de azúcares neutros en la fracción KOH 4% y el aumento en la fracción KOH 24%. Luego en el estadio III aumentó la proporción de azúcares en la fracción Na₂CO₃ y disminuyó en la fracción KOH 24%.

Cuadro 2.7. Contenido de azúcares neutros en mg/g de AIR y porcentaje (%) en las fracciones de pared celular de cerezas 'Newstar' durante diferentes estadios de su ontogenia^a.

Contenido de azúcares neutros (%)												
Fracción	Estadios											
	I			II			III			IV		
H ₂ O	39,7 ±	0,6	a	40,0 ±	0,3	a	42,1 ±	3,9	a	48,2 ±	0,5	b
CDTA	23,0 ±	0,4	b	22,1 ±	0,8	ab	20,6 ±	1,6	a	23,9 ±	0,6	b
Na ₂ CO ₃	32,0 ±	0,7	ab	30,9 ±	0,9	a	38,0 ±	4,5	bc	39,6 ±	0,7	c
KOH 4%	46,9 ±	3,6	c	31,7 ±	1,8	a	38,0 ±	1,2	ab	42,6 ±	2,9	bc
KOH 24%	40,1 ±	0,6	a	66,4 ±	0,6	c	60,4 ±	1,0	b	80,0 ±	0,3	d

Contenido de azúcares neutros (mg/g AIR)												
Fracción	Estadios											
	I			II			III			IV		
H ₂ O	18,1 ±	0,2	a	19,8 ±	0,1	a	40,5 ±	3,7	b	58,4 ±	0,6	c
CDTA	25,0 ±	0,4	a	29,3 ±	1,0	b	23,7 ±	1,8	a	34,7 ±	0,8	c
Na ₂ CO ₃	92,0 ±	2,1	a	83,4 ±	2,5	a	96,0 ±	11,3	a	84,3 ±	1,6	a
KOH 4%	42,9 ±	3,3	a	36,2 ±	2,1	a	51,3 ±	1,7	b	68,1 ±	4,6	c
KOH 24%	28,7 ±	0,5	a	46,6 ±	0,4	c	42,7 ±	0,7	b	55,9 ±	0,2	d

^aLos valores representan las medias ± desvío estándar (n=3). Las letras indican diferencias significativas dentro de cada fracción de pared celular (fila) en los diferentes estadios (p<0,05).

El contenido de azúcares neutros (en mg / g de AIR) sufrió cambios importantes hacia la madurez, siendo el cambio más significativo el gran aumento (triplica el valor) del contenido de azúcares en la fracción H_2O , en gran parte debido al aumento del rendimiento de la fracción a más del doble del valor inicial. Asimismo, otras fracciones también sufrieron aumentos significativos como las fracciones KOH 24%, 4% y CDTA (alrededor de 95%, 59% y 39% del valor inicial respectivamente). Por otro lado la fracción Na_2CO_3 no varió, manteniéndose constante durante todo el periodo analizado.

En los estadios intermedios hubo algunas variaciones en el contenido de azúcares neutros en las fracciones. En el estadio II se produjo el aumento del contenido en la fracción CDTA (en coincidencia con el rendimiento) mientras que disminuyó en la fracción KOH 24%. En cambio en el estadio III disminuyó el contenido de azúcares en la fracción CDTA y KOH 24% y aumentó en las fracciones H_2O y KOH 4%.

2.3.4 Cambios en la composición y concentración de azúcares neutros durante la ontogenia del fruto.

Se analizó la composición de azúcares neutros mediante la obtención de acetatos de alditos, siendo ramnosa (Ram), fucosa (Fuc), arabinosa (Ara), xilosa (Xil), manosa (Man), galactosa (Gal) y glucosa (Glc) los monosacáridos observados (en diferentes proporciones) en cada estadio y fracción. Tanto en frutos firmes (Cuadro 2.8) como en frutos blandos (Cuadro 2.9), los azúcares preponderantes en las fracciones pécticas (H_2O , CDTA y Na_2CO_3) fueron la arabinosa, la galactosa y en menor medida la ramnosa.

2.3.4.1 ‘Sweetheart’

En frutos firmes la proporción molar de arabinosa tendió a aumentar levemente en la fracciones de glicanos entrecruzantes y a disminuir levemente en la fracciones pécticas CDTA y Na_2CO_3 a medida que avanzaba su ontogenia, mientras que en la fracción H_2O presentó la misma concentración inicial hacia la madurez. Tampoco la galactosa exhibió variaciones significativas, aumentando muy levemente en la fracción H_2O y disminuyendo apenas en CDTA. En cuanto a la ramnosa, se observó un aumento de la concentración a madurez en las tres fracciones pécticas. El monosacárido xilosa, mostró una disminución a madurez en estas fracciones: su disminución en la fracción KOH 4% fue la más notable de todas las observadas para cualquiera de los monosacáridos estudiados.

Cuadro 2.8 Composición de azúcares neutros en moles % de las fracciones pécticas y de glicanos de la matriz en cada uno de los estadios de crecimiento (I: división celular, II: esclerificación del endocarpo III: crecimiento exponencial, IV: Madurez) de cerezas ‘Sweetheart’.

Fracción	Estadio	Concentración de azúcares neutros (moles %)						
		Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc
H ₂ O	I	6	1	36	10	11	27	10
	II	5	1	31	8	14	29	14
	III	7	1	39	6	9	30	10
	IV	8	1	36	5	7	32	10
CDTA	I	11	tr	70	3	tr	16	tr
	II	11	1	62	3	4	15	3
	III	12	1	72	2	2	10	2
	IV	13	1	65	2	2	13	3
Na ₂ CO ₃	I	7	tr	85	1	--	7	--
	II	8	tr	78	1	-	11	1
	III	10	1	79	1	tr	7	1
	IV	12	1	78	1	-	7	1
KOH 4%	I	5	2	53	16	3	11	11
	II	5	1	63	10	3	11	7
	III	4	1	60	11	4	10	10
	IV	6	1	64	9	3	9	9
KOH 24%	I	3	2	25	20	10	13	27
	II	3	3	24	21	10	15	25
	III	3	2	23	18	11	16	27
	IV	3	2	29	17	10	14	26

tr: trazas

2.3.4.2 ‘Newstar’

En los frutos blandos (cuadro 2.9), la proporción molar de arabinosa aumentó hacia la madurez en las fracciones pécticas mientras que disminuyó en la fracción de glicanos entrecruzantes fuertemente unidos. Simultáneamente, la concentración de galactosa disminuyó hacia madurez en alta proporción en la fracción Na₂CO₃, y en mucha menor medida en las fracciones CDTA y KOH 4%, mientras que aumentó considerablemente la concentración en la fracción H₂O y bastante menos en la KOH 24%. La ramnosa, que forma parte de las estructuras de ramnogalacturonanos mantuvo prácticamente constante su concentración durante ontogenia, sólo se observó un leve aumento de la concentración desde el estadio III hacia madurez en la fracción Na₂CO₃. Por otro lado las moléculas de xilosa, que forman parte de las estructuras o ramificaciones de glicanos entrecruzantes, no variaron su concentración desde el estadio I al IV en las fracciones de glicanos entrecruzantes.

Para estimar la proporción en que se encuentra la arabinosa en relación a las cadenas laterales ricas en galactosa de las fracciones pécticas (H₂O, CDTA y Na₂CO₃) se utilizó la relación arabinosa/galactosa (Ara/Gal). Se encontró que en los frutos

blandos (Figura 2.2A) la proporción de arabinosa con respecto a la galactosa era alta en las fracciones Na_2CO_3 y CDTA con relaciones entre 6,18 y 27,2. Lo mismo ocurrió en los frutos firmes (Figura 2.3A) donde se presentó un comportamiento similar en estas fracciones pécticas y las relaciones variaron desde 4,1 hasta 11,4.

Cuadro 2.9 Composición de azúcares neutros en moles %, de las fracciones pécticas y de glicanos de la matriz en cada uno de los estadios de crecimiento (I: división celular, II: esclerificación del endocarpo III: crecimiento exponencial, IV: Madurez) de cerezas ‘Newstar’.

Fracción	Estadio	Concentración de azúcares neutros (moles %)						
		Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc
H_2O	I	6	--	41	10	14	20	10
	II	6	1	33	9	13	28	11
	III	6	1	44	7	8	25	9
	IV	6	1	46	6	6	28	7
CDTA	I	8	1	67	8	3	11	3
	II	9	1	74	3	3	9	2
	III	8	1	78	1	1	10	tr
	IV	9	1	79	1	1	8	1
Na_2CO_3	I	8	1	74	4	--	13	tr
	II	8	1	87	1	--	3	--
	III	11	1	80	1	tr	6	1
	IV	11	1	80	1	tr	6	1
KOH 4%	I	5	1	52	16	3	13	9
	II	5	2	45	20	5	13	12
	III	5	1	60	11	4	10	10
	IV	5	1	51	14	5	11	12
KOH 24%	I	3	3	22	21	10	15	27
	II	3	3	21	21	12	14	27
	III	2	2	15	21	14	17	29
	IV	2	3	15	22	12	17	29

tr: trazas

Conociendo que la mayor parte de arabinosa y galactosa están asociadas a regiones “ramificadas” de las pectinas, se calculó la relación $(\text{Ara} + \text{Gal}) / \text{Ram}$ para estimar la importancia relativa de las cadenas laterales de azúcares neutros con respecto al esqueleto ramnogalacturonano (RG). En los frutos blandos (Figura 2.2B) esa relación aumentó levemente en las fracciones acuosa y CDTA a medida que avanzaba la maduración hasta el estadio III. En cambio en la fracción Na_2CO_3 , disminuyó a partir del estadio III, sugiriendo un aumento de la solubilidad de las pectinas más ramificadas a medida que progresaba la maduración.

Por otro lado en las tres fracciones pécicas de los frutos firmes (Figura 2.3B), la relación disminuyó a medida que avanzó la maduración, sugiriendo una pérdida de cadenas laterales con la maduración. Los glicanos entrecruzantes presentaron pequeñas proporciones de pectinas. De acuerdo a los datos obtenidos, las mismas presentaron una relación Ara/Gal inferior a las de las fracciones de pectinas (Figs. 2.2A y 2.3A). Asimismo, la relación (Ara+Gal)/Ram fue mayor que en las fracciones de pectinas (Figs. 2.2B y 2.3B), sugiriendo que los restos pécicos que quedaron en los glicanos entrecruzantes presentaron mayor proporción de ramificaciones.

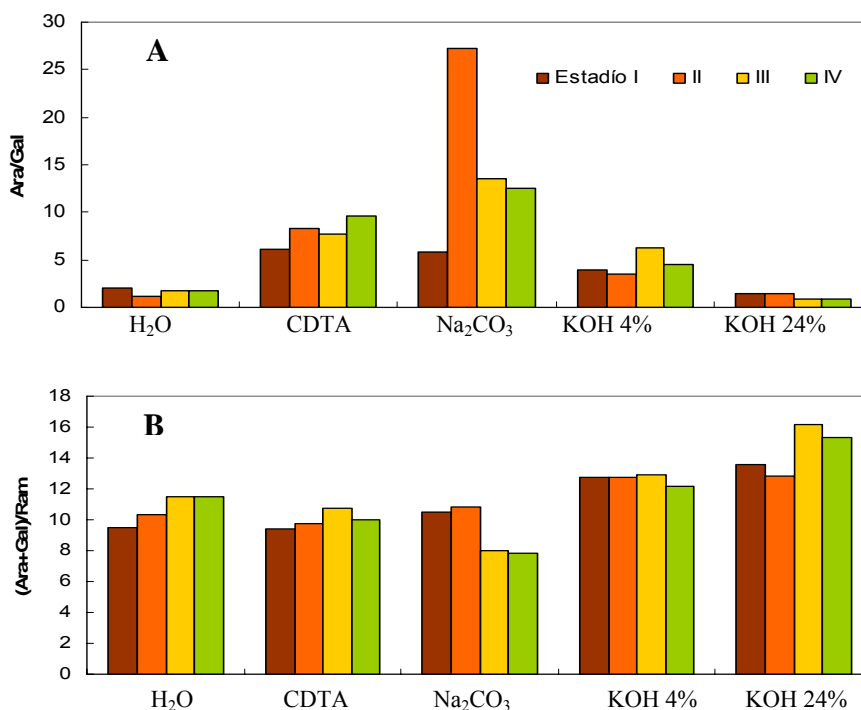


Figura 2.2. Relación Ara/Gal (A) y (Ara+Gal)/Ram (B) de pectinas y glicanos entrecruzantes de la pared celular de cerezas ‘Newstar’. Las barras contiguas representan los 4 estadios de desarrollo.

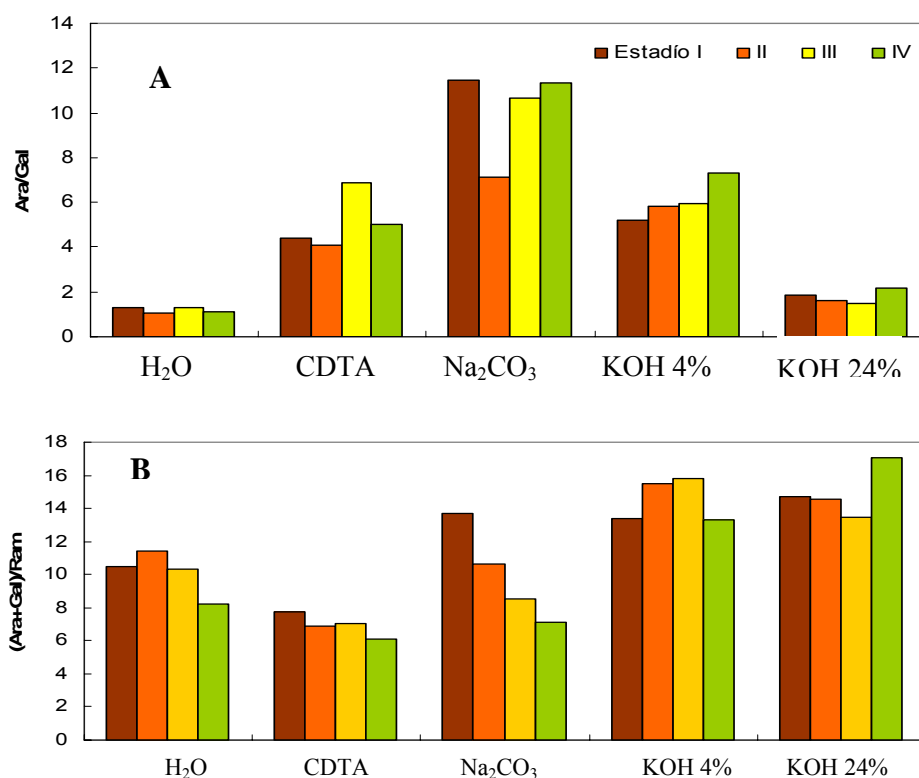


Figura 2.3. Relación Ara/Gal (A) y (Ara+Gal)/Ram (B) de pectinas y glicanos entrecruzantes de la pared celular de cerezas 'Sweetheart'. Las barras contiguas representan los 4 estadios de desarrollo.

Analizando comparativamente para cada variedad el total de azúcares neutros y ácidos urónicos obtenidos de acuerdo al rendimiento de cada fracción (Cuadro 2.10), se observó que el total de azúcares neutros en los frutos blandos fue mayor en todos los estadios que en los frutos firmes y además aumentó progresivamente durante ontogenia, mientras que en los frutos firmes, se mantuvo constante durante los primeros tres estadios y luego disminuyó en el último. Por otro lado, cuantificando el total de ácidos urónicos, en frutos firmes se mantuvo estable el contenido de urónicos hasta el estadio II y luego disminuyó drásticamente a un valor aún más bajo que los frutos blandos.

Cuadro 2.10. Contenido total de azúcares neutros y ácidos urónicos (expresados en mg/g de AIR) en cada uno de los estadios de crecimiento (I: división celular, II: esclerificación del endocarpio, III: crecimiento exponencial, IV: Madurez) de cerezas blandas cv. **Newstar** y firmes cv. **Sweetheart**.

Estadio	Azúcares neutros (mg/g de AIR)	Acidos urónicos (mg/g de AIR)	Azúcares neutros (mg/g de AIR)	Acidos urónicos (mg/g de AIR)
I	206,8	288,2	179,6	309,4
II	215,1	313,1	189,4	310,7
III	254,2	270,8	191,2	234,6
IV	301,6	257,4	127,1	209,1

2.3.5. Despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes

De cada una de las fracciones ricas en pectinas y glicanos entrecruzantes se analizó la distribución del tamaño molecular mediante filtración en gel de Sepharose CL-6B y CL-2B, respectivamente.

2.3.5.1 ‘Newstar’

Los resultados mostraron que en la fracción acuosa de frutos blandos (Figura 2.4) se presentaron dos picos, uno de polímeros de alto (pico de la izquierda) y otro de bajo peso molecular (pico hacia la derecha). Estos se fueron modificando a medida que avanzó la ontogenia del fruto, observándose una notable pérdida relativa de moléculas de alto peso molecular en el estadio III (durante el alargamiento celular), que persistió en el estadio IV de madurez. Debe apreciarse que en estos dos estadios, la proporción de fracción acuosa aumentó, sugiriendo que se produjo un incremento relativo de los productos de bajo peso molecular.

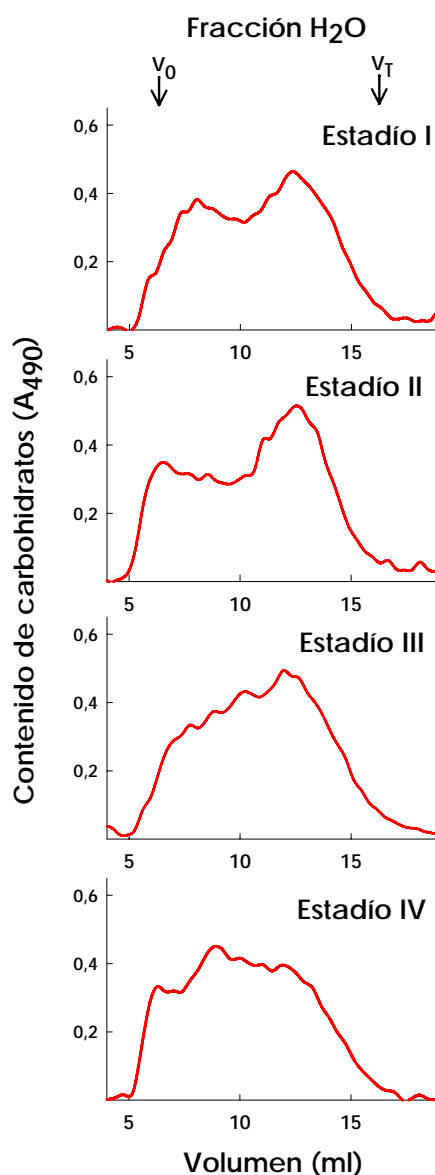


Figura 2.4. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos blandos (cv. Newstar) de la fracción H_2O durante ontogenia, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. V_0 , volumen vacío; V_T , volumen total.

En la fracción CDTA (Figura 2.5) se observó el aumento de moléculas de alto peso molecular en el estadio III, que puede explicarse fácilmente por la migración de aquellas de bajo peso molecular hacia la fracción extraída con agua. Hacia madurez (est. IV) hubo una recuperación relativa del estado anterior, como lo indica también el rendimiento, y se observó un incremento en la proporción de aquellas de mediano peso molecular. Mientras tanto, en la fracción Na_2CO_3 no se observó modificaciones durante la ontogenia, indicándose que no hubo despolimerización durante la misma.

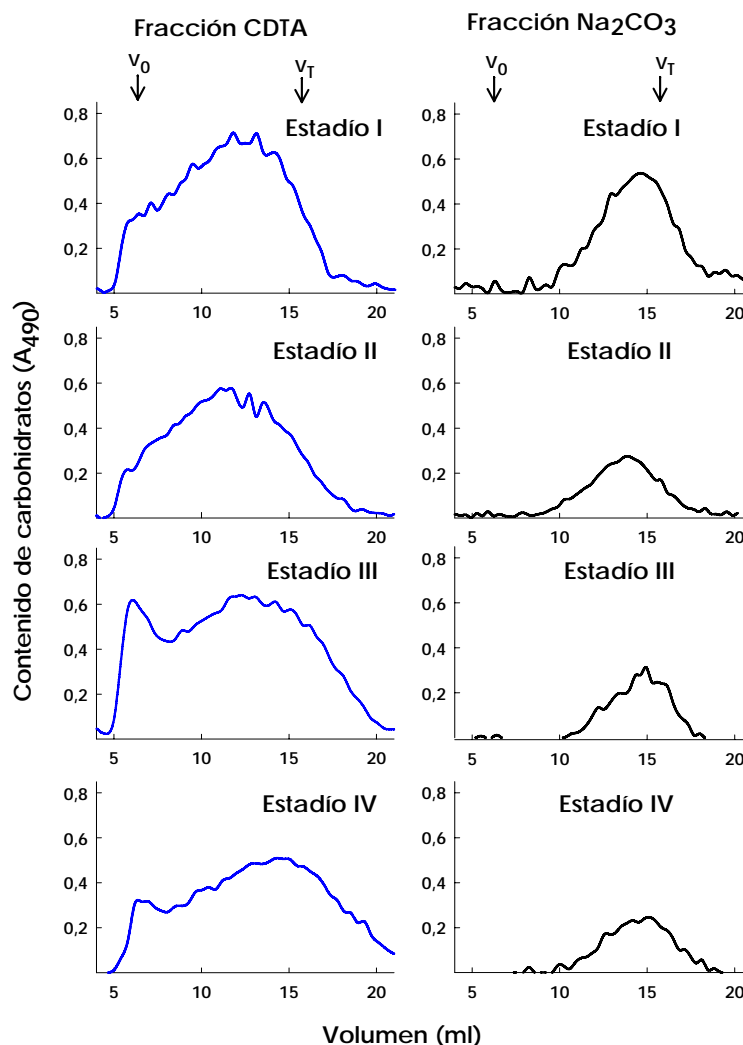


Figura 2.5. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos blandos (cv. Newstar) de las fracciones CDTA y Na_2CO_3 durante ontogenia, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-2B. V_0 , volumen vacío; V_T , volumen total.

De acuerdo a los perfiles de peso molecular de glicanos (fracciones KOH 4% y 24%) en frutos blandos (Figura 2.6), la fracción de glicanos unidos fuertemente, KOH 24%, fue la que tuvo un cambio más evidente a través de la ontogenia, perdiendo moléculas de alto peso molecular desde el estadio I hasta el IV. Esa disminución fue claramente observable pese a que esta fracción presentó un solo pico característico, incluido dentro del volumen central de la columna en todos los estadios. Al mismo tiempo, la fracción de glicanos unidos débilmente, KOH 4%, que presentó dos picos de alto y bajo peso molecular sufrieron solo cambios menores durante la ontogenia: se apreció una disminución de la fracción de mayor peso molecular en el estadio III que luego se recuperó parcialmente en el estadio IV.

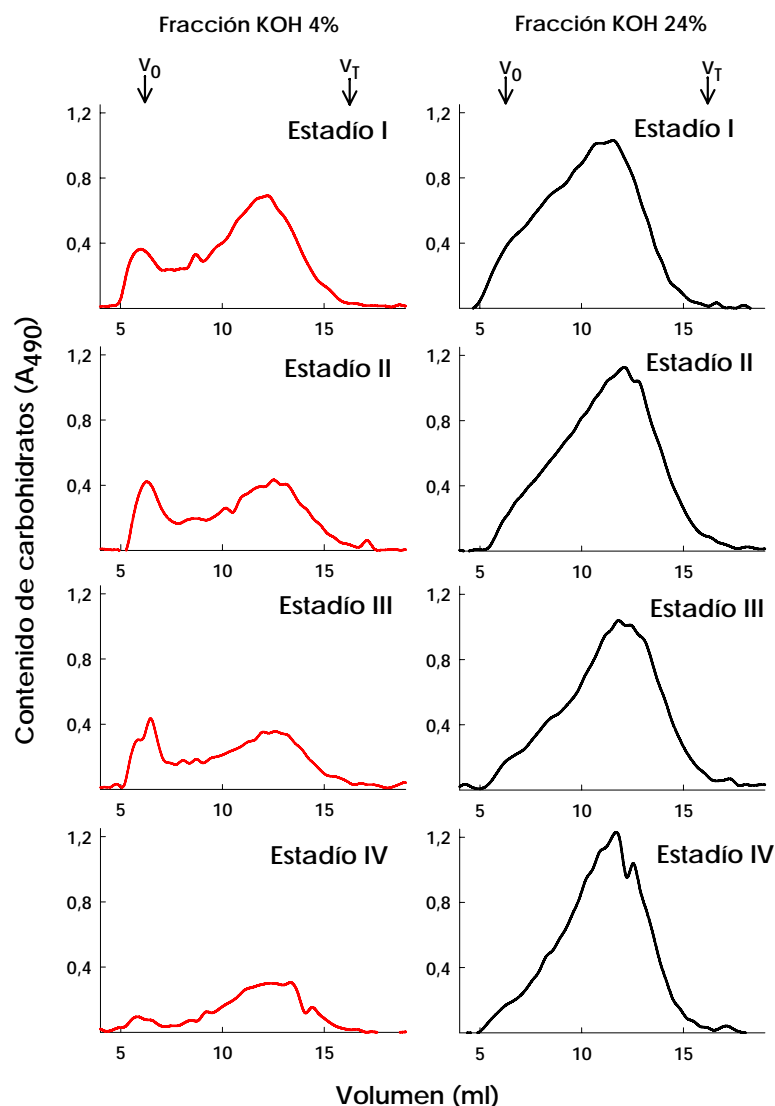


Figura 2.6. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos blandos (cv. Newstar) de las fracciones KOH 4% y KOH 24% durante el crecimiento, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. V_0 , volumen vacío; V_T , volumen total.

2.3.5.2 'Sweetheart'

En esta variedad, la distribución de tamaños moleculares de la fracción acuosa (Figura 2.7) presentó una dispersión de pesos moleculares, y un incremento de la fracción de bajo peso molecular en el estadio II (de bajo rendimiento), pero ninguna otra tendencia de cambios sustanciales durante la ontogenia.

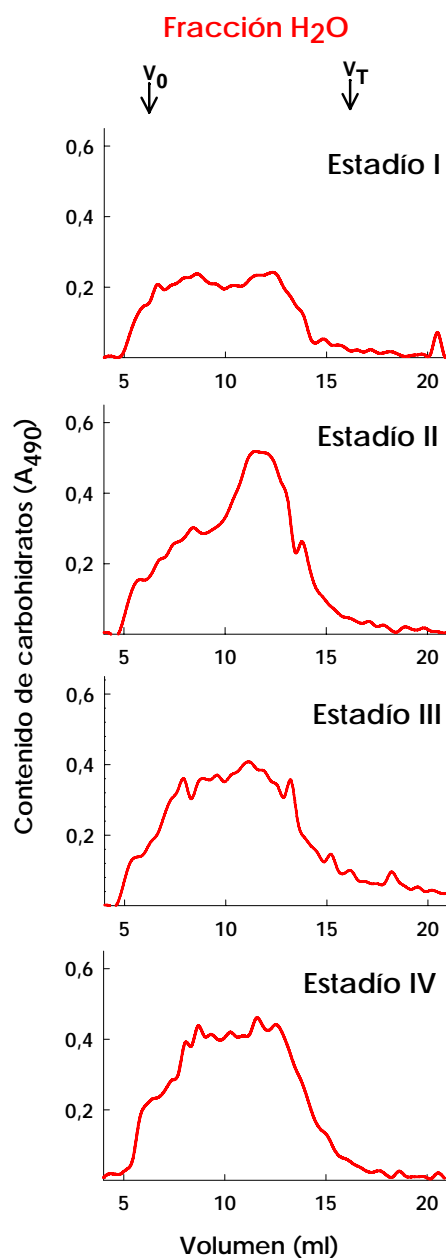


Figura 2.7. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos firmes (cv Sweetheart) de la fracción H₂O durante ontogenia, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. V_0 , volumen vacío; V_T , volumen total.

En las pectinas unidas iónica y covalentemente, fracciones CDTA y Na₂CO₃ respectivamente (Figura 2.8), no se observaron cambios mayores en ninguno de los estadios, aunque para la fracción de CDTA se pudo apreciar que la fracción de mayor peso molecular se resolvió más claramente a partir del estadio III.

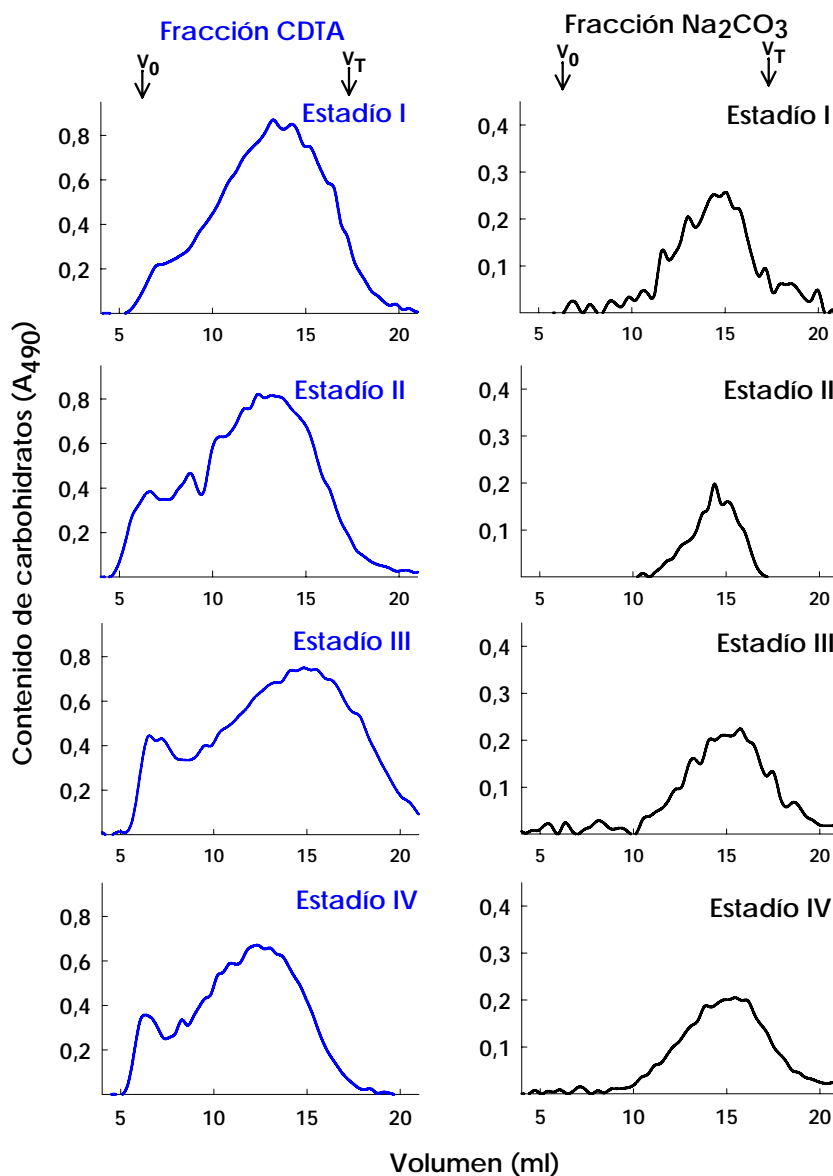


Figura 2.8. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos firmes (cv. Sweetheart) de las fracciones CDTA y Na_2CO_3 durante ontogenia, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-2B. V_0 , volumen vacío; V_T , volumen total.

La fracción KOH 4% presentó dos picos (Figura 2.9), de alto y bajo peso molecular los cuales no modificaron mayormente su magnitud hacia madurez. En cambio, sí sufrieron una pérdida de moléculas de alto peso molecular los glicanos de la fracción KOH 24%, desplazándose la curva hacia aquellas moléculas de medio y bajo peso molecular, tal como ocurrió con la variedad Newstar.

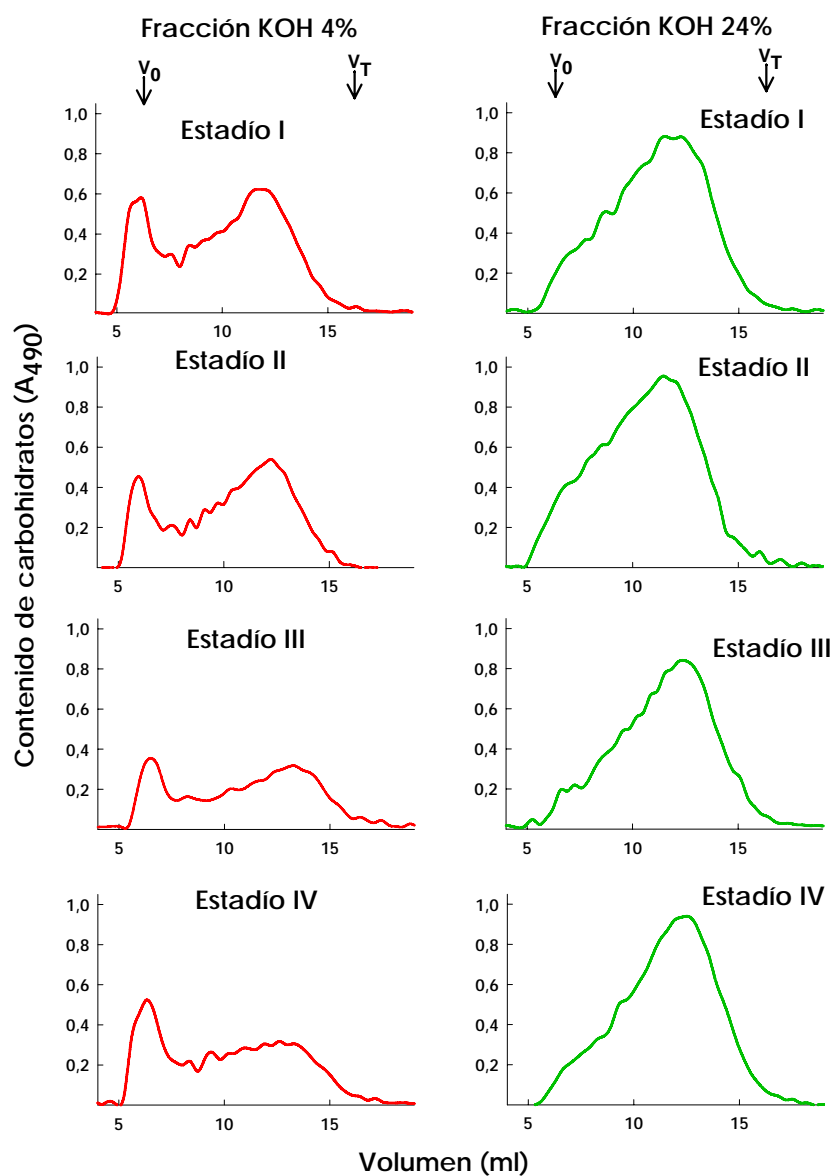


Figura 2.9. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos firmes (cv. Sweetheart) de las fracciones KOH 4% y KOH 24% durante el crecimiento, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. V_0 , volumen vacío; V_T , volumen total.

2.4 DISCUSIÓN

En cerezas se ha relacionado la mayor firmeza de los frutos con la época de maduración tardía (Christensen 1995) y el genotipo (Choi et al. 2002a). Coincidentemente con esto, las cerezas cv. Sweetheart, genotipo de maduración tardía, fueron más firmes que la cv. Newstar de maduración temprana. Sin embargo, a medida que estas variedades maduran disminuye su firmeza llegando a valores casi similares a madurez. Lo mismo ocurre en otras especies del género *Prunus* como duraznos, ciruelas y nectarinas, donde la firmeza disminuye cuando el fruto comienza la etapa de maduración (Crisosto 1994). En este trabajo, la medición de la firmeza en los frutos de maduración temprana no fue determinada antes de los 44 ddpf. En consecuencia, no se pudo determinar la caída abrupta de la firmeza, como se había observado en los frutos firmes, debido al breve periodo de crecimiento. Fils-Lycaon y Buret (1990) mostraron que la firmeza disminuyó a menos de la mitad en menos de una semana.

En concordancia con la época de maduración, los frutos blandos presentaron una etapa II (lignificación del endocarpo) casi imperceptible en comparación con los frutos firmes en concordancia con Looney et al. (1996a). Además, el contenido de sólidos solubles, el peso y diámetro ecuatorial aumentaron constantemente durante todas las etapas del crecimiento de los frutos blandos, mientras que en la etapa II de los frutos firmes hubo un retraso en el aumento de estos parámetros.

La pared celular constituida por pectinas, hemicelulosas y celulosa entre otros, sufre cambios en sus componentes durante el crecimiento y maduración de los frutos. Estos cambios se expresan, entre otros factores, por el rendimiento de Residuo Insoluble en Alcohol (AIR) expresado en g/100g peso fresco (%). En varios frutos se ha determinado este rendimiento pero el método de extracción ha variado dependiendo del grupo de investigación y a través de los años. No obstante, en este trabajo se siguió la metodología utilizada por Brummell et al. (2004) para la extracción de pared celular (AIR). Considerando este punto, algunos autores han obtenido AIR con metodologías similares, de diferentes cultivares de cerezas maduras con resultados entre 1,08 y 1,46% (Choi et al. 2002a) y 1,5 % del peso fresco en cerezas Bigarreau Napoleón (Barbier y Thibault 1982). En otros casos se obtuvo Sólidos Insolubles en Alcohol (AIS), método en el cual no se hierva la muestra con etanol sino que se lava con el mismo y luego es resuspendido en una solución de cloroformo:etanol o solamente en etanol al 70%, con rendimientos entre 1,05 y 2,13 g/100g peso fresco en cerezas ‘Lambert’ y ‘Bing’ a madurez respectivamente (Facteau 1982b). En el presente trabajo los valores obtenidos (1,77 y 1,53 g/100g peso fresco para ‘Sweetheart’ y ‘Newstar’ respectivamente) en el estadio IV de madurez, fueron similares a los valores obtenidos por otros autores con otras metodologías de extracción.

La disminución del rendimiento de AIR durante ontogenia y con valores análogos en cada estadio para ambas variedades, fue similar a lo encontrado por Batisse et al. (1996b) cuando compararon frutos de texturas blandas y crujientes de una variedad de cereza durante ontogenia. Sin embargo, cuando se obtuvo el rendimiento de AIR por fruto no se observó tal disminución sino más bien un aumento hacia madurez lo que concuerda con los resultados de Batisse et al. (1996b), Fils-Lycaon y Buret (1990) y Mitcham et al. (1989). Estos autores sugieren que este aumento durante el crecimiento y expansión celular es consecuencia de la permanente síntesis de los componentes de la pared celular. A pesar que durante el crecimiento del fruto aumenta el contenido de

agua del mismo, también lo hace paralelamente la superficie de pared celular y su volumen y en consecuencia el contenido de AIR parecería no disminuir.

Por otra parte también la metodología de fraccionamiento de la pared celular ha cambiado a través de los años y en distintos grupos de trabajo; por lo tanto los resultados de este trabajo no son totalmente comparables con los obtenidos por otros autores. Anteriormente, la extracción secuencial se realizaba con 1) agua, 2) oxalatos, EDTA o hexametáfosfato de sodio, 3) 0,05M HCl caliente o 0,05M NaOH frío para obtener pectinas libres altamente metoxiladas, pectinas o pectatos libres de baja metoxilación y protopectinas (la parte insoluble de las sustancias pécticas solubles). En cambio, aplicando la metodología utilizada por Sozzi et al. (2002) se obtienen extractos ricos en pectinas solubles en agua, pectinas iónicamente unidas solubles en CDTA y pectinas covalentemente unidas solubles en Na_2CO_3 , extractos de glicanos entrecruzantes solubles en KOH 4% (débilmente unidos) y KOH 24% (glicanos entrecruzantes fuertemente unidos).

El fraccionamiento de pectinas y hemicelulosas de frutos blandos y firmes concuerda sólo parcialmente con los resultados de Batisse et al. (1996b), donde los frutos crujientes sufrían una disminución de los polímeros débilmente asociados a la pared celular desde el estadio verde maduro mientras que los polímeros fuertemente asociados aumentaban. En el presente trabajo, en frutos firmes aumentó la proporción de glicanos entrecruzantes (fracciones extraídas con KOH) que luego disminuyeron marcadamente a madurez mientras que los frutos blandos, sólo la fracción KOH 4% (de glicanos débilmente unidos) parece aumentar hacia madurez. Sin embargo, al igual que en el trabajo de Choi et al. (2002a), los frutos blandos tuvieron una mayor cantidad de pectinas solubles en H_2O y CDTA que los frutos firmes hacia madurez.

El aumento de pectinas solubles en la fracción H_2O durante la maduración se observó en otros frutos como uvas (Nunan et al. 1998), cerezas ‘Bigarreau Napoleón’ (Fils-Lycaon y Buret 1990), ciruelas japonesas (Ponce et al. 2010), frambuesa (Vicente et al. 2007), peras ‘Bartlett’ (Ahmed y Labavitch 1980), banana (Duan et al. 2008) y kiwi (Redgwell et al. 1992). Simultáneamente, este incremento se relacionó con la disminución de pectinas en las fracciones CDTA y/o Na_2CO_3 (Brummell, 2006) en manzana (Yoshioka et al. 1992), tomate (Carrington et al. 1993) y palta (Wakabayashi et al. 2000). Tanto en cerezas blandas (cv. Newstar) como en las firmes (cv. Sweetheart) hubo un aumento hacia madurez de pectinas solubles en agua y CDTA, posiblemente en detrimento de las pectinas de la fracción Na_2CO_3 .

Durante la maduración, con el aumento de pectinas en la fracción H_2O también se produce una pérdida de ácidos urónicos (componentes de las estructuras pécticas), como ocurre en peras (Ahmed y Labavitch 1980; Yoshioka et al. 1992) y uvas (Nunan et al. 1998). En cerezas firmes (cv. Sweetheart) la proporción de ácidos urónicos aumentó hacia madurez pero en el caso de las cerezas blandas el comportamiento fue el opuesto ya que disminuyó la proporción de urónicos hacia madurez. En consecuencia, la solubilización de pectinas en frutos blandos daría lugar a una menor firmeza que en los frutos firmes. Sin embargo, cuando se analizó el total de azúcares neutros y ácidos urónicos según el rendimiento obtenido de cada fracción (cuadro 2.10), los frutos firmes tuvieron un menor contenido de azúcares neutros y ácidos urónicos que los frutos blandos hacia el estadio IV de madurez pero se mantuvieron constantes en los primeros estadios. Esto concuerda con el trabajo de Choi et al. (2002a), donde sugieren que la firmeza está vinculada a la cantidad total de azúcares neutros y ácidos urónicos de las pectinas, pero no a la de los glicanos entrecruzantes.

Otros autores en cambio (Chen et al. 2009), dirigieron sus investigaciones a diferenciar la forma y ubicación de la estructuras de la pared de cerezas chinas (*Prunus pseudocerasus* L.) y observaron que en frutos firmes, las ramificaciones de los glicanos entrecruzantes se disponen en la misma dirección y son más anchas, mientras que en los frutos blandos las ramificaciones se disponen de forma irregular y son más angostas, relacionando todo esto con las diferencias texturales de ambos tipos de frutos. De la misma forma Batisse et al. (1996a) analizó a nivel ultraestructural la pared celular de cerezas dulces y observó que a medida que avanza la ontogenia del fruto se produce la solubilización de la laminilla media y la reestructuración de la pared primaria en los frutos firmes. Por el contrario en los frutos blandos la laminilla media está mejor preservada pero la pared primaria es fina y muestra más vesículas de degradación formadas por residuos de membrana. Se puede sugerir que en el presente trabajo la conservación de la estructura péctica sería la responsable de la firmeza y que esta estructura rígida sea la que dificulta la actividad enzimática en la pared primaria de los frutos firmes.

La despolimerización tanto de pectinas como hemicelulosas es un proceso que ocurre normalmente en la maduración de especies como palta, uva, kiwi, melón, durazno, pera, tomate e higo, aunque en manzana no se produce (Goulao 2008). Tanto en nectarinas como en kiwis (Dawson et al. 1992; Redgwell et al. 1992) los resultados indican que la solubilización de pectinas precede a su despolimerización. Sin embargo en cerezas, si bien las fracciones pécticas de los frutos blandos presentan solubilización, ni los frutos blandos ni los firmes parecen sufrir despolimerización. En cambio sí se produjo despolimerización de los glicanos entrecruzantes especialmente los unidos fuertemente durante ontogenia, de forma similar a lo que ocurre en frutillas (Huber 1984).

A diferencia de la mayoría de los frutos, el ablandamiento de las cerezas no parece depender de la despolimerización de pectinas dado que se observó una insignificante actividad de la enzima PG durante la maduración de la fruta (Batisse et al. 1996b). No obstante, hay evidencias en cerezas del aumento de la actividad de otras enzimas como β -glucosidasa y β -galactosidasa durante ontogenia las cuales promueven la solubilización de pectinas a partir de la desvinculación de algunas uniones covalentes entre ellas (Gerardi et al. 2001). La supresión de la actividad β -galactosidásica en estadios tempranos de la maduración reduce significativamente el ablandamiento de los frutos sugiriendo que la remoción de galactosa de las cadenas laterales de las pectinas es un factor importante en los cambios en la pared celular que llevan a la pérdida de firmeza durante la maduración.

Se ha observado que la pérdida de galactosa es muy pronunciada en especies como tomate, durazno, melón y manzana pero no parece ser importante en ciruelas, damascos, peras europeas, arándanos o frambuesas (Brummell 2006; Gross y Sams 1984). En el presente trabajo si bien es el segundo monosacárido más importante en cantidad, no se observaron variaciones de galactosa en frutos firmes durante ontogenia en comparación con los frutos blandos, en los cuales se produjo una gran disminución en la fracción Na_2CO_3 al tiempo que aumentó en la fracción H_2O . Esto indicaría que la pérdida de galactosa como componente de las de las cadenas laterales de las estructuras pécticas, estaría involucrada en la disminución de la firmeza sobre todo en frutos blandos. Sin embargo, esto no concuerda con Redgwell et al. (1997b) quienes indican que la disminución de galactosa no es un proceso vinculado con el ablandamiento de los frutos sino más bien con la solubilización de las pectinas.

En contraposición, en ciruelas la arabinosa fue el azúcar neutro que más se perdió (Ponce et al. 2010), mientras que en duraznos ésta pérdida se produjo en las fracciones correspondientes a glicanos entrecruzantes (Brummell et al. 2004). En cambio en cerezas el comportamiento fue diferente según su firmeza. En cerezas este monosacárido no pareció afectarse e incluso en algunas fracciones aumentó a medida que avanzaba la maduración. La aparición de arabinosa en las fracciones de glicanos hace suponer la presencia de pectinas que forman parte de una estructura que no es fácilmente extraíble ni accesible a la acción enzimática y que podría estar asociada a la celulosa o a las hemicelulosas, lo que coincide con los resultados de Redgwell et al. (1997b) quien obtuvo arabinogalactanos asociados fuertemente con celulosa. Brummell (2006) indica que tanto la pérdida de galactosa como de arabinosa se pueden observar en diversos frutos, con relación a los procesos de maduración, y que generalmente ocurren en los extractos concentrados de álcalis más que en los extractos de pectinas débilmente unidas. También agrega que los azúcares que se pierden en los extractos de álcalis estarían ligados a los procesos de ablandamiento de los frutos. Sin embargo, en el presente trabajo en cerezas, sólo se observó la pérdida de galactosa en las fracciones pécticas.

2.5 CONCLUSIONES

En conclusión, los cambios más evidentes durante la ontogenia de las cerezas dulces (*Prunus avium* L.) son la pérdida de firmeza, el aumento del contenido de sólidos solubles y del peso, mientras que al mismo tiempo se producen cambios a nivel de pared celular de forma diferencial según la variedad. De este modo se puede corroborar la hipótesis A, ya que en los distintos estados ontogénicos se determinan modificaciones sustantivas en la constitución de la pared celular de cerezas dulces de características contrastantes, durante su desarrollo en el árbol.

Durante ontogenia en los frutos blandos se producen la pérdida de azúcares neutros como galactosa en las pectinas unidas covalentemente, la solubilización de pectinas y la despolimerización de glicanos entrecruzantes unidos fuertemente (fracción KOH 24%). Por otro lado los frutos firmes presentaron despolimerización de glicanos entrecruzantes unidos fuertemente (fracción KOH 24%). Todo esto demuestra que existen diferencias dentro de una misma especie dadas por la pérdida de azúcares neutros específicos según sean frutos blandos o firmes lo que parcialmente coincide con la hipótesis C la cual enuncia que durante la adquisición de textura fundente, el ablandamiento de las cerezas dulces se vincularía con la pérdida de azúcares neutros de las cadenas laterales de pectinas y glicanos entrecruzantes. En este trabajo no se observó la pérdida de azúcares neutros en los glicanos entrecruzantes. Asimismo se sugiere que la solubilización de pectinas parecería ser un factor importante que influye en la firmeza de la variedad de frutos blandos (cv. Newstar). Esta solubilización de pectinas en frutos blandos podría estar vinculada a la degradación de la pared primaria y no de la laminilla media e inversamente en los frutos firmes ya que lo que más se afectaría es la pérdida de azúcares neutros de la lamina media lo que podría estar afectando la unión entre células contiguas.

Por último, la despolimerización de glicanos entrecruzantes durante ontogenia parece ser un factor común en ambas variedades de cerezas pero no se observó despolimerización de pectinas. De esta forma se acepta sólo en parte la hipótesis B la cual enuncia que los cambios en la pared celular de las cerezas dulces se asociarían en

primer término a una despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes, unidos más o menos estrechamente a la celulosa y que este proceso ocurre a través de casi toda la ontogenia del fruto.

CAPITULO 3

EFFECTO DE LOS DAÑOS MECÁNICOS PRODUCIDOS EN CEREZAS DULCES (*PRUNUS AVIUM* L.) SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR DE LOS FRUTOS.

3.1 INTRODUCCIÓN

Algunos investigadores han estudiado los factores que influyen en la susceptibilidad de los frutos de diversas especies a los daños mecánicos (García et al. 1995; Underhill et al. 1998) y métodos para contrarrestar la incidencia de esos daños con el uso de poliaminas (Pérez-Vicente et al. 2002), 1-MCP (De Martino et al. 2006) y ácido giberélico (Looney 1996b). Uno de los más estudiados es el efecto de la temperatura, en algunos casos como el tomate donde se vuelve más susceptible al daño mecánico cuanto mayor es la temperatura de almacenamiento (12 vs 20°C) del fruto (Van linden et al. 2006). En cambio, en el trabajo de Crisosto et al. (1993) se observó que cerezas expuestas a bajas temperaturas (<10°C) en postcosecha eran más susceptibles al daño por impacto. Más aún, el estado de madurez de los frutos también determina la susceptibilidad al pitting, ya que en cerezas, Toivonen et al. (2004) observaron que en estadios de madurez más avanzados la susceptibilidad disminuía en los cultivares Bing, Lapins y Sweetheart (en orden decreciente de susceptibilidad).

En aquellos frutos de comportamiento climatérico, el daño mecánico genera un estrés que desencadena el proceso de maduración gracias a la síntesis del etileno (Wang et al. 2002) y la expresión de genes asociados a la maduración y patogénesis. Al mismo tiempo, este tipo de daño está vinculado con la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) las cuales causan daño en las organelas de las células debido a la peroxidación de los lípidos de membrana (De Martino et al. 2006). Por otro lado, en respuesta al daño mecánico se sintetizan enzimas que degradan la pared celular como pectin metilesterasa y poligalacturonasa (Van linden et al. 2008). No obstante, también se liberan de la pared celular fragmentos de oligogalacturónidos (OGAs), se sintetizan sistemina y jasmonato, los cuales podrían inducir la síntesis de etileno en cultivos de células de tomate (O'Donnell et al. 1996).

Se plantea entonces el problema de qué es lo que ocurre con la cereza ya que es una fruta no climatérica y en consecuencia el etileno no sería el factor desencadenante de cambios organolépticos durante la maduración (Palou et al. 2003). En cambio, ante el daño mecánico se adelantaría el proceso de senescencia; sin embargo, no existen trabajos que estudien el efecto producido sobre la constitución de la pared celular en cerezas, excepto en tomate (Van linden et al. 2008).

Por lo tanto, para describir lo que ocurre en esta fruta se propone como objetivo de esta sección caracterizar y comparar la composición, el proceso de solubilización y despolimerización de la pared celular de los frutos de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) dañados mecánicamente, en dos cultivares de firmeza contrastantes. Para ello, se puso a prueba la hipótesis que establece que el daño mecánico en cerezas dulces, induce modificaciones en los polisacáridos de la pared celular de la zona afectada de forma diferencial según la firmeza de la variedad.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Para la determinación de daño mecánico por impacto se utilizaron cerezas ‘Sweetheart’ y ‘Newstar’ cosechadas en estado de madurez de cosecha según las especificaciones para cada variedad (color: rojo y contenido de sólidos solubles mayor a 14%), en la localidad de Los Antiguos, provincia de Santa Cruz (65° 3’ Latitud Oeste, y 46° 3’ Latitud Sur) a 250 m.s.n.m., al pie de la Cordillera de Los Andes. La fruta fue transportada en cajas de cartón corrugado apoyadas sobre algodón para evitar daños durante el transporte. Previo a realizar las mediciones de índices fisiológicos y el análisis de pared celular se eliminaron frutos con cualquier tipo de daño y malformados.

Para evaluar el daño por impacto se realizaron los siguientes tratamientos: Daño mecánico por impacto (D), consistió en dejar caer libremente los frutos desde una altura de 70 cm y a una temperatura del fruto cercana a 20°C, de modo tal que cada uno impacte sobre la superficie en los dos hombros del mismo (los hombros están ubicados a 90 grados de la sutura del fruto). La superficie de impacto era de cerámica, lisa y dura, y se utilizaron muestras de 150 frutos de cada variedad. Mientras, otro grupo de 150 frutos de las mismas variedades no fueron expuestas a daños por impacto considerándolos frutos testigo (T). El primer día del tratamiento se contó como día 0. Posteriormente, tanto los frutos testigo como los dañados se almacenaron a 12°C y 90% de humedad relativa hasta 10 días. Al 7mo día se comenzó a visualizar levemente en la piel del fruto el daño mecánico como una zona de depresión más oscura que el resto del fruto y se extrajeron muestras de la zona dañada para el análisis de la pared celular de los frutos tratados y testigo. A los 10 días se volvieron a extraer muestras para el análisis de pared celular.

3.2.2 Índices fisiológicos, índices de madurez de cerezas

Antes de iniciar el experimento se realizaron las siguientes mediciones en cada una de las variedades:

3.2.2.1 Diámetro ecuatorial

Se determinó individualmente en 30 frutos de cada variedad en el radio ecuatorial de los mismos el diámetro mayor de los frutos con un calibre electrónico.

3.2.2.2 Firmeza

La firmeza se determinó individualmente sobre el radio ecuatorial de 30 frutos en los lados opuestos a la sutura donde se ubica el diámetro mayor, sin remover la piel, midiendo la fuerza requerida para deformarlo hasta 2 mm. Se utilizó el equipo Instron Universal Testing Machine (modelo 3342, Canton, MA, USA). Cada fruto fue ubicado entre placas de acero y deformado con una velocidad de cruceta de 20 mm min⁻¹. La firmeza se expresó en Newton.

3.2.2.3 Color

La medición de color se realizó utilizando un colorímetro Minolta CR-300 (Osaka, Japón), evaluando las coordenadas L* (‘lightness’ o luminosidad), C* (‘croma’ o grado de saturación del color de la muestra) y h° (‘hue angle’), según el

protocolo diseñado por Trinchero et al., 2004. La lectura se realizó en dos puntos equidistantes en contraposición a la sutura, sobre la altura de los hombros de cada fruto, en 40 frutos de la variedad Newstar y en 60 frutos de la variedad Sweetheart.

3.2.2.4 Contenido de sólidos solubles

Se efectuaron mediciones de sólidos solubles del jugo de ambas variedades con un refractómetro de mano autocompensado (Atago) tomando 3 repeticiones de 5 frutos por variedad. Los resultados se expresaron en porcentaje.

3.2.3 Extracción, fraccionamiento y análisis de la pared celular (Ver Capítulo 2 punto 2.4.3)

Se tomaron muestras de los frutos Testigo (T: sin daño mecánico) y Dañados (D) a los 7 y 10 días del inicio del experimento. De cada fruto se extrajo con escalpelo el pericarpo (epi y mesocarpo) de frutos Testigo y el pericarpo de la zona afectada por impacto en los frutos Dañados. El tejido fue inmediatamente congelado a -18°C y almacenado hasta su análisis.

3.2.4 Análisis estadístico

Los resultados de color, firmeza, diámetro ecuatorial, sólidos solubles, ácidos urónicos y azúcares neutros fueron analizados mediante ANOVA. La homogeneidad de varianza y normalidad fueron probadas por medio de los test de Levene y Shapiro-Wilk's respectivamente. Las comparaciones entre medias de los tratamientos se realizaron mediante el test de Tukey ($P < 0.05$).

3.3 RESULTADOS

3.3.1. Características físicas de las cerezas firmes y blandas ('Sweetheart' y 'Newstar').

Se determinó la firmeza de frutos 'Sweetheart' y 'Newstar' maduros antes de realizar el tratamiento de daño mecánico. Pudo observarse que en los frutos 'Sweetheart' (Cuadro 3.1), este parámetro fue significativamente mayor que los frutos 'Newstar'. Además se evaluó el porcentaje de sólidos solubles antes de iniciar los tratamientos y se observó que los valores promedio fueron similares no encontrándose diferencias significativas.

Cuadro 3.1. Comparación de diámetro, firmeza, porcentaje de sólidos solubles y color (L^* , C^* , h°) de cerezas 'Sweetheart' y 'Newstar' a cosecha.

Variedad	Diámetro	Firmeza	%SS	L^*	Color C^*	h°
Sweetheart	25,7 a	1,8 a	18,1 a	30,8 a	27,4 a	28,1 a
Newstar	27,4 b	1,2 b	19,5 a	28,7 a	16,8 a	33,5 a

Los valores representan las medias. Letras diferentes indican diferencias significativas entre variedades (columna) ($p < 0,05$).

El color de la piel de los frutos no fue significativamente diferente para ambas variedades al momento de la cosecha en ninguno de los tres parámetros analizados (L^* , C^* y h°). Por otra parte se observan diferencias significativas en el diámetro de los frutos siendo ‘Newstar’ los más grandes.

3.3.2 Efecto del daño mecánico sobre la pared celular de cerezas firmes y blandas (‘Sweetheart’ y ‘Newstar’).

3.3.2.1 Extracción secuencial de pared celular.

De las muestras de ambas variedades se obtuvieron las paredes celulares (Residuo Insoluble en Alcohol: AIR) de los frutos Testigo (T) y Dañados (D) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento. En estas variedades el rendimiento obtenido de AIR (Cuadro 3.2) fue levemente mayor en los frutos dañados que en aquellos utilizados como testigo.

Cuadro 3.2. Rendimiento del Residuo Insoluble en Alcohol (AIR) cada 100g de peso fresco de frutos firmes (cv Sweetheart) y blandos (cv. Newstar), expuestos a daño mecánico (D) y testigo (T), muestreados a los 7 y 10 días después de iniciado el tratamiento.

Tratamiento	Rendimiento (g AIR/100gr PF)	
	Sweetheart	Newstar
T 7 días	1,51	1,51
T 10 días	1,61	1,51
D 7 días	1,80	1,92
D 10 días	1,75	1,84

Para la variedad Newstar (Cuadro 3.3.), a partir del fraccionamiento de la pared celular en diferentes pectinas y glicanos entrecruzantes, se observó como resultado más importante, un contenido notablemente alto de pectinas unidas iónicamente (fracción CDTA) y menor de pectinas unidas covalentemente (fracción Na_2CO_3) tras el daño mecánico. Asimismo, los glicanos débilmente unidos (fracción KOH 4%) parecen disminuir tras el daño a los 7 días y aumentar a 10 días, mientras que se mantuvieron estables aquellos fuertemente unidos (fracción KOH 24%).

Mientras que en los frutos testigo la cantidad de pectinas unidas covalentemente (fracción Na_2CO_3) no sufrieron cambios, en los dañados aumentaron al pasar de los 7 a los 10 días. Además se observó que el contenido de glicanos entrecruzantes unidos fuertemente (fracción KOH 24%) no varió sustancialmente en los diferentes días ni con los tratamientos.

En los frutos dañados, se observó el aumento de la fracción de glicanos entrecruzantes unidos débilmente (fracción KOH 4%) mientras que en los frutos testigo esta fracción tiende a disminuir entre 7 y 10 días.

Cuadro 3.3. Fracciones extraídas de cerezas ‘Newstar’ en frutos dañados (D) y testigo (T) a los 7 y 10 días de realizado el tratamiento expresadas en g/100g AIR.

Muestra	Fracciones				
	H ₂ O	CDTA	Na ₂ CO ₃	KOH 4%	KOH 24%
T 7 d	10,66	7,61	19,75	14,64	5,67
T 10 d	12,30	12,06	19,02	10,20	6,78
D 7 d	10,85	18,65	7,33	11,51	6,20
D 10 d	7,48	28,14	12,90	14,36	5,44

A diferencia de ‘Newstar’, en la variedad Sweetheart (frutos firmes, Cuadro 3.4) no se observaron cambios marcados en los frutos testigo del contenido de pectinas y glicanos entrecruzantes. En los frutos dañados sólo se observó a los 7 días un mayor contenido de pectinas unidas iónicamente y menor de aquellas unidas covalentemente con respecto al testigo. Empero, en los frutos dañados se observó una disminución desde los 7 a los 10 días del contenido de pectinas unidas iónicamente (fracción CDTA) y aumento de las unidas covalentemente (fracción Na₂CO₃).

Al igual que en los frutos testigo, los glicanos entrecruzantes débilmente unidos (fracción KOH 4%) de los frutos dañados no presentaron variaciones, pero en cambio en la fracción KOH 24% sí se produjo un leve aumento hacia los 10 días.

Cuadro 3.4. Fracciones extraídas de cerezas ‘Sweetheart’ en frutos dañados (D) y testigo (T) a los 7 y 10 días de iniciado el tratamiento expresadas en g/100g AIR.

Muestra	Fracciones				
	H ₂ O	CDTA	Na ₂ CO ₃	KOH 4%	KOH 24%
T 7 d	10,29	11,32	24,18	17,50	5,89
T 10 d	11,10	11,40	24,74	16,42	5,46
D 7 d	9,39	17,17	18,75	16,88	6,98
D 10 d	9,48	12,22	21,86	15,79	9,20

Si se comparan los valores totales de pectinas y glicanos entrecruzantes de ambas variedades se puede observar que el contenido total de pectinas fue mayor en los frutos firmes tanto en los testigos como dañados a los 7 días. Más aún, los frutos firmes presentaron un mayor contenido de glicanos entrecruzantes (esto es fracciones KOH 4% y 24%) que los frutos blandos y sobre todo en aquellos frutos que fueron dañados.

3.3.3 Solubilización, composición de azúcares neutros y despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes de la pared celular de cerezas ‘Newstar’.

En esta variedad de frutos blandos, no se observaron cambios en los frutos testigo, ni a los 7 ni a los 10 días, del contenido de urónicos en las fracciones Na₂CO₃, KOH 4% y KOH 24% pero sí hubo un aumento del contenido en las fracciones H₂O y CDTA (Cuadro 3.5). Por el contrario, en los frutos dañados se observaron aumentos del contenido de urónicos entre los 7 y 10 días en prácticamente todas las fracciones. La variación entre los tratamientos en el contenido de urónicos de la fracción KOH 24%

coincidió con los rendimientos similares (Cuadro 3.3). Además gracias al mayor rendimiento de la fracción Na_2CO_3 , se observó un mayor contenido de ácidos urónicos en los frutos testigo que en los dañados (Cuadro 3.5).

Tanto a los 7 como a los 10 días de iniciado el experimento, en los frutos dañados se observó que el contenido total de ácidos urónicos en la fracción CDTA es más del doble que en los frutos testigo. El gran incremento de urónicos en esta fracción coincidió con su mayor rendimiento (Cuadro 3.3). Al mismo tiempo hubo un menor contenido en las fracciones H_2O y Na_2CO_3 con respecto a los frutos testigo, también relacionado con los rendimientos obtenidos de estas fracciones.

Cuadro 3.5 Contenido de ácidos urónicos en miligramos por gramo de AIR en las fracciones de pared celular de cerezas ‘Newstar’ en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.

Fracción	Contenido de ácidos urónicos (mg/g de AIR)			
	Dañados		Testigo	
	7 d	10 d	7 d	10 d
H_2O	15,7 ± 0,6 a	22,4 ± 2,3 b	39,7 ± 3,4 c	56,1 ± 1,0 d
CDTA	137,1 ± 2,7 c	182,7 ± 11,5 d	48,2 ± 0,8 a	82,5 ± 3,8 b
Na_2CO_3	19,5 ± 0,8 a	64,1 ± 1,2 b	82,4 ± 9,9 c	94,5 ± 3,4 c
KOH 4%	10,0 ± 1,1 a	14,7 ± 0,6 b	9,2 ± 1,0 a	9,4 ± 1,0 a
KOH 24%	2,2 ± 0,1 ab	3,6 ± 0,3 b	1,6 ± 0,1 a	2,6 ± 1,3 ab

Los valores representan las medias ± desvío estándar (n=3). Las letras indican diferencias significativas dentro de cada fracción de pared celular (fila) entre fechas y tratamientos (p<0,05).

Analizando los cambios en las proporciones de ácidos urónicos en las distintas fracciones de los 2 tratamientos en ambas fechas de muestreo (Cuadro 3.6) se observó que la fracción CDTA es la más rica en ácidos urónicos en todas ellas. En los frutos testigo, tanto esta fracción como KOH 24% no variaron entre los 7 y 10 días pero sí se produjo un aumento en las fracciones H_2O , Na_2CO_3 y KOH 4%.

Cuadro 3.6 Contenido de ácidos urónicos en porcentaje (%) en las fracciones de pared celular de cerezas ‘Newstar’ en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.

Fracción	Contenido de ácidos urónicos (%)			
	Dañados		Testigo	
	7 d	10 d	7 d	10 d
H_2O	14,5 ± 0,5 a	29,9 ± 3,0 b	37,2 ± 3,2 c	45,6 ± 0,8 d
CDTA	73,5 ± 1,5 b	64,9 ± 4,1 a	63,3 ± 1,1 a	68,4 ± 3,1 ab
Na_2CO_3	26,7 ± 1,1 a	49,7 ± 1,0 c	41,7 ± 5,0 b	49,7 ± 1,8 c
KOH 4%	8,7 ± 1,0 b	10,3 ± 0,4 b	6,3 ± 0,7 a	9,2 ± 1,0 b
KOH 24%	3,6 ± 0,2 a	6,7 ± 0,5 b	2,8 ± 0,1 a	3,9 ± 1,9 ab

Los valores representan las medias ± desvío estándar (n=3). Las letras indican diferencias significativas dentro de cada fracción de pared celular (fila) entre fechas y tratamientos (p<0,05).

Por el contrario, en los frutos dañados disminuyó la proporción de urónicos en la fracción CDTA desde los 7 a los 10 días mientras que aumentó en las fracciones H_2O , Na_2CO_3 y KOH 24%. No obstante, la única fracción en la que no hubo cambios significativos fue en KOH 4%. Más allá de las variaciones en las proporciones de ácidos

urónicos en las distintas fracciones, en la fracción H₂O de los frutos dañados la proporción de urónicos fue mucho menor que en los testigos.

Asimismo, la proporción de ácidos urónicos a los 7 días de iniciado el experimento fue menor en los frutos dañados que en los testigos, pero a los 10 días ya no se observaron diferencias significativas.

El contenido de azúcares neutros (los cuales forman parte de las ramificaciones de pectinas y el esqueleto principal y las ramificaciones de los glicanos entrecruzantes) en los frutos testigo (Cuadro 3.7) no presentaron cambios en las fracciones H₂O, CDTA y KOH 4%, mientras que sí se observó una disminución significativa en la fracción Na₂CO₃ y un leve aumento en KOH 24%. Por otro lado, los frutos dañados presentaron aumentos significativos desde los 7 a los 10 días en casi todas las fracciones excepto en la fracción CDTA. Además es de destacar que en estas fracciones, excepto CDTA, se observó un menor contenido de azúcares neutros en los frutos dañados con respecto al testigo tanto a los 7 como a los 10 días.

Cuadro 3.7 Contenido de azúcares neutros en miligramo por gramo de AIR de las fracciones de pared celular de la variedad **Newstar** en frutos dañados y testigo a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.

Fracción	Contenido de azúcares neutros (mg/g de AIR)			
	Dañados		Testigo	
	7 d	10 d	7 d	10 d
H ₂ O	29,3 ± 0,3 a	36,7 ± 0,3 b	50,0 ± 1,8 c	46,8 ± 2,0 c
CDTA	29,4 ± 0,7 ab	37,1 ± 5,7 b	23,4 ± 2,4 a	33,2 ± 4,5 ab
Na ₂ CO ₃	14,3 ± 1,5 a	42,5 ± 2,5 b	95,8 ± 2,3 d	66,2 ± 0,3 c
KOH 4%	30,9 ± 3,1 a	39,4 ± 3,3 b	47,9 ± 0,9 c	45,1 ± 1,4 cb
KOH 24%	20,0 ± 0,1 a	28,9 ± 1,1 b	31,7 ± 0,9 c	39,9 ± 1,4 d

Los valores representan las medias ± desvío estándar (n=3). Las letras indican diferencias significativas dentro de cada fracción de pared celular (fila) entre fechas y tratamientos (p<0,05).

Teniendo en cuenta la proporción de azúcares neutros en los frutos testigo (Cuadro 3.8), se observó que la proporción de azúcares neutros disminuyó desde los 7 a los 10 días en las fracciones H₂O y Na₂CO₃, mientras que se mantuvo estable en las fracciones CDTA y KOH 24% y aumentó en la fracción KOH 4%. A pesar de que la fracción KOH 24% presentó bajo contenido de azúcares neutros con respecto a otras fracciones, se observó que una gran proporción de los mismos se encuentra en ésta fracción.

En los frutos dañados (Cuadro 3.8) se observó que la proporción de azúcares neutros fue menor que en los testigos cuando se los compara a los 7 días, siendo variable esta situación a los 10 días de iniciado el tratamiento. De forma similar a lo que se observó en el cuadro 3.6, se produjo el aumento de la proporción de azúcares desde el día 7 al 10 en las fracciones H₂O, Na₂CO₃ y KOH 24%, pero sin cambios significativos en las fracciones CDTA y KOH 4%.

Cuadro 3.8 Contenido de azúcares neutros en porcentaje (%) de las fracciones de pared celular de la variedad **Newstar** en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.

Fracción	Contenido de azúcares neutros (%)			
	Dañados		Testigo	
	7 d	10 d	7 d	10 d
H ₂ O	27,0 ± 0,3 a	49,1 ± 0,4 c	46,9 ± 1,7 c	38,0 ± 1,6 b
CDTA	15,8 ± 0,4 a	13,2 ± 2,0 a	30,7 ± 3,2 b	27,5 ± 3,7 b
Na ₂ CO ₃	19,6 ± 2,0 a	32,9 ± 1,9 b	48,5 ± 1,1 c	34,8 ± 0,2 b
KOH 4%	26,9 ± 2,7 a	27,5 ± 2,3 a	32,8 ± 0,6 b	44,2 ± 1,4 c
KOH 24%	32,3 ± 0,1 a	53,1 ± 2,1 b	56,0 ± 1,5 bc	58,9 ± 2,0 c

Los valores representan las medias ± desvío estándar (n=3). Las letras indican diferencias significativas dentro de cada fracción de pared celular (fila) entre fechas y tratamientos (p<0,05).

Analizando la composición de azúcares neutros (Cuadro 3.9), se observó que los azúcares más importantes en proporción molar son la arabinosa (Ara), galactosa (Gal), glucosa (Glc), xilosa (Xil) y ramnosa (Ram) en orden decreciente. También se encontraron otros componentes menores, como manosa (Man) y fucosa (Fuc). La arabinosa fue el azúcar que más cambios sufrió bajo los diferentes tratamientos (Figura 3.1). En la fracción CDTA, tanto en los frutos dañados como en los frutos testigo disminuyó la proporción de arabinosa a los 10 días de iniciado el experimento (Cuadro 3.9). Sin embargo a los 7 días los frutos dañados tienen menor proporción molar de este azúcar con respecto a los testigos. En las fracciones H₂O y Na₂CO₃ las proporciones de arabinosa a los 7 y 10 días son similares para frutos testigos y dañados, aumentando hacia los 10 días. Una situación inversa se produjo entre los glicanos entrecruzantes donde en la fracción KOH 4% se observó una gran disminución en la proporción de Ara a los 10 días en los frutos dañados, con respecto al testigo.

La galactosa no presentó cambios en su proporción molar en los glicanos entrecruzantes (fracciones KOH) y pectinas (fracción CDTA y Na₂CO₃). Sin embargo, se produjo una gran disminución de este azúcar desde los 7 a los 10 días del inicio del experimento, exclusivamente en la fracción acuosa, y coincidente con el aumento de la arabinosa en esas mismas fracciones. Tanto la fucosa como la manosa no presentaron cambios en sus proporciones molares en todos los tratamientos. Ni en las fracciones pécicas ni en las de glicanos entrecruzantes se produjo cambios en la proporción molar de ramnosa, con excepción de lo que ocurrió en la fracción CDTA donde se observó una menor proporción en los frutos testigo en comparación con los dañados a los 10 días.

La xilosa es un azúcar importante en la estructura de la pared celular. Es un componente menor de cadenas laterales de pectinas, pero uno fundamental como constituyente de hemicelulosas. En los glicanos entrecruzantes no se observaron diferencias en su proporción excepto en KOH 24%, donde los frutos dañados a los 7 días tenían una menor proporción de xilosa que los frutos testigo. En la fracción CDTA, se observó que la proporción de xilosa fue mayor en los frutos testigo que en los dañados sobre todo a los 10 días de iniciado el experimento.

Por último, la proporción de glucosa no presentó diferencias entre las distintas fracciones y tratamientos.

Cuadro 3.9 Composición de azúcares neutros en moles % de cerezas ‘Newstar’, en las fracciones de pared celular de frutos dañados (D) y testigo (T) a los 7 y 10 días de iniciado el tratamiento.

Fracción	Tratamiento	Concentración de azúcares neutros (moles%)						
		Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc
H ₂ O	D 7d	7	1	43	6	5	29	9
	D 10d	7	1	51	6	5	22	8
	T 7d	8	1	43	8	6	31	3
	T 10d	7	1	50	8	5	23	6
CDTA	D 7d	10	1	80	1	1	8	1
	D 10d	9	1	78	1	1	9	2
	T 7d	8	1	84	2	1	5	-
	T 10d	6	1	78	4	1	9	1
Na ₂ CO ₃	D 7d	10	1	77	1	1	8	3
	D 10d	9	tr	80	2	tr	7	2
	T 7d	9	1	79	2	tr	7	2
	T 10d	9	tr	82	2	--	7	1
KOH 4%	D 7d	6	1	61	7	3	10	13
	D 10d	7	1	58	8	3	10	14
	T 7d	6	1	59	11	4	10	10
	T 10d	5	1	65	9	3	10	8
KOH 24%	D 7d	2	2	20	19	12	15	30
	D 10d	2	2	18	23	11	14	30
	T 7d	2	2	19	23	11	15	28
	T 10d	2	2	21	24	10	14	27

tr: trazas

El efecto del daño mecánico sobre la composición total de azúcares neutros del AIR (Figura 3.1), donde se tuvo en cuenta para el cálculo la contribución de cada azúcar y rendimiento de cada fracción a los distintos tratamientos, dio como resultado un menor contenido de arabinosa, galactosa y xilosa en los frutos dañados (D) que en los testigos (T). Además los ácidos urónicos tampoco se vieron influídos por los tratamientos a los 7 días pero sí se observó que el aumento de urónicos a los 10 días en los dañados fue mayor que los testigos. El contenido de ácidos urónicos totales fue llamativamente superior en ambos productos almacenados durante 10 días que en aquellos retirados a los 7 días.

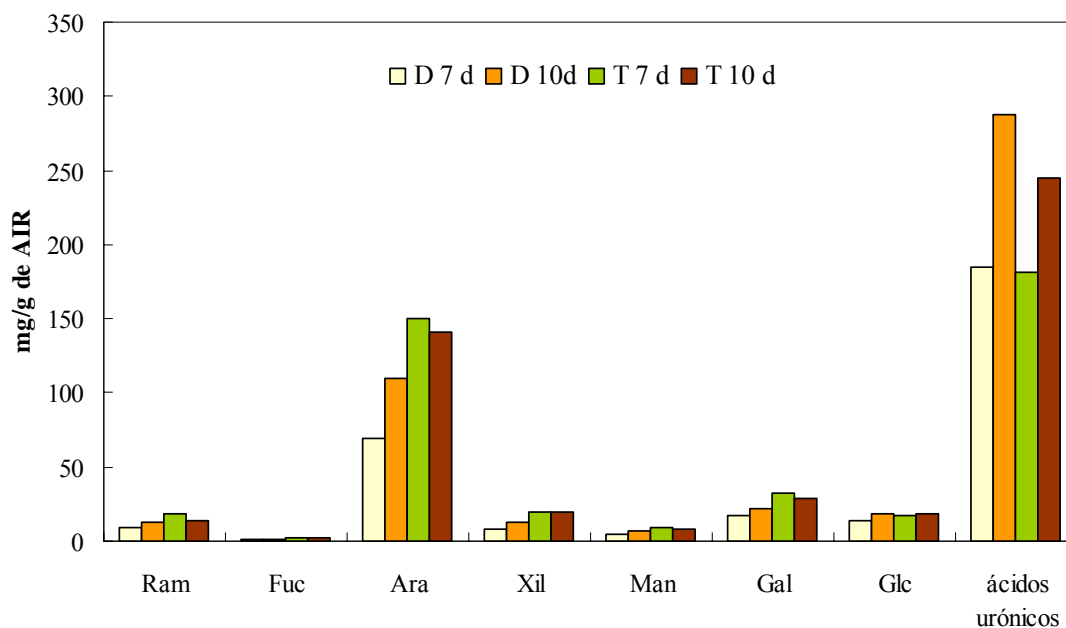


Figura 3.1 Contenido de azúcares neutros y ácidos urónicos en miligramos por gramo de AIR de cerezas 'Newstar', de los tratamientos Dañados (D 7d y D 10d) y Testigos (T 7d y T 10d) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.

El perfil en permeación de geles de las fracciones pécticas (Figura 3.2 y 3.3) y de los glicanos entrecruzantes (Figura 3.4) dan idea del peso molecular de las distintas moléculas de polisacáridos que conviven en cada fracción y como se afectan por los diferentes tratamientos. En la fracción H₂O de los frutos testigo (Figura 3.2) hubo una mayor proporción de polímeros de peso molecular alto y medio, que disminuyó levemente entre 7 y 10 días, mientras que en los dañados a los 7 días ya se observó una disminución mayor de la proporción de polímeros de alto peso molecular, con un corrimiento hacia los de peso molecular medio y bajo.

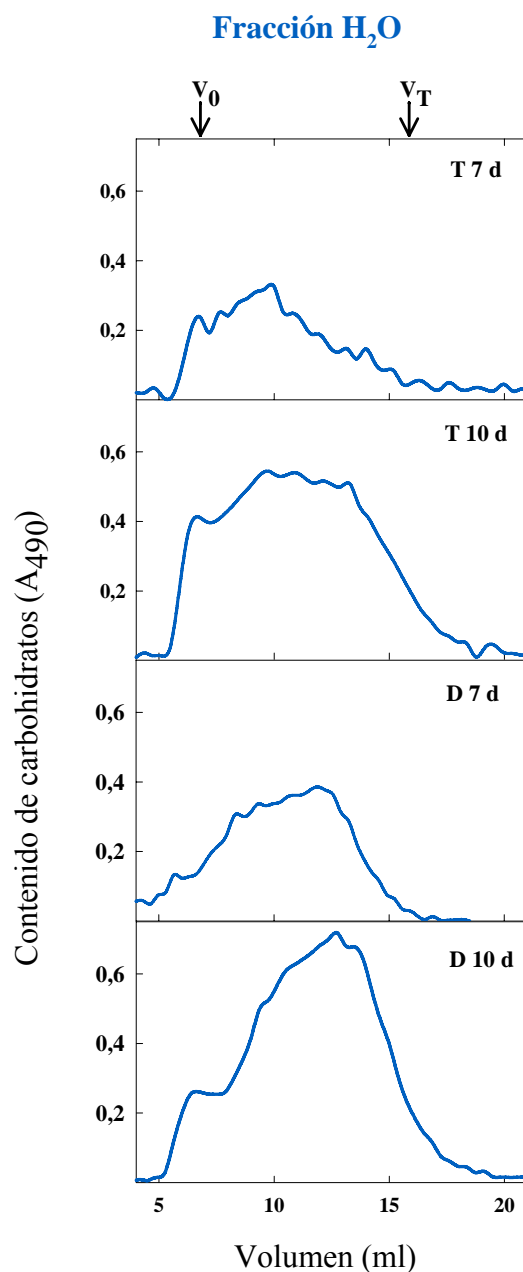


Figura 3.2. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos blandos (cv Newstar) de la fracción H₂O, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. Frutos testigos (T) y frutos dañados (D) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento. V₀, volumen vacío; V_T, volumen total.

En la fracción CDTA (Figura 3.3) no se observó despolimerización de pectinas en los frutos testigo a distintos tiempos. En estos se diferenciaron dos picos, uno de alto y otro de bajo peso molecular bastante bien definidos. En cambio, en los frutos dañados desapareció el pico de alto peso molecular, con lo que sólo se observó un pico ancho correspondiente a pectinas de menor peso molecular. En los frutos dañados a los 10 días se observó una degradación aún mayor de las pectinas.

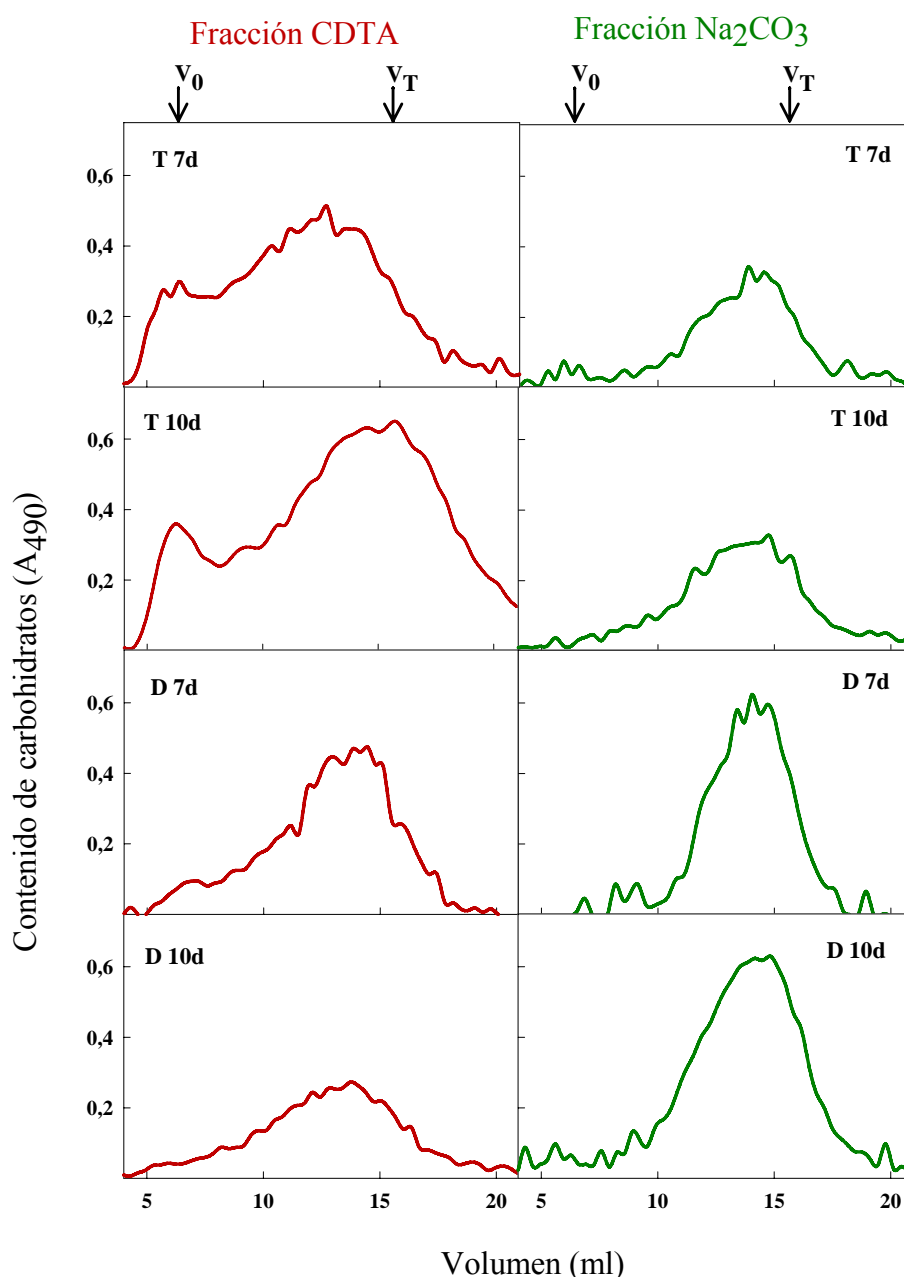


Figura 3.3. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos blandos (cv. Newstar) de las fracciones CDTA y Na_2CO_3 , fraccionadas en una columna de Sepharose CL-2B. Frutos testigo (T) y frutos dañados (D) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento. V_0 , volumen vacío; V_T , volumen total.

La fracción Na_2CO_3 (Figura 3.3), correspondiente a pectinas unidas covalentemente, sólo presentó un pico ancho, característico de polisacáridos de medio y bajo peso molecular. No se observaron grandes variaciones con el tratamiento, aunque en los frutos dañados se apreció una tendencia a agudizarse el pico que corresponde a los polisacáridos de menor peso molecular.

La despolimerización de glicanos entrecruzantes débilmente unidos está representada por la fracción KOH 4% (la Figura 3.4), con dos picos característicos de polisacáridos de alto y bajo peso molecular. En los frutos testigo se observó un pequeño tercer pico con moléculas de mediano peso molecular. En los frutos dañados a los 7 días hubo una clara disminución del primer pico y la desaparición del segundo, evidenciando

así la despolimerización. A los 10 días, los productos de mayor peso molecular prácticamente desaparecieron, de modo que ambos picos no se diferencian de forma definida.

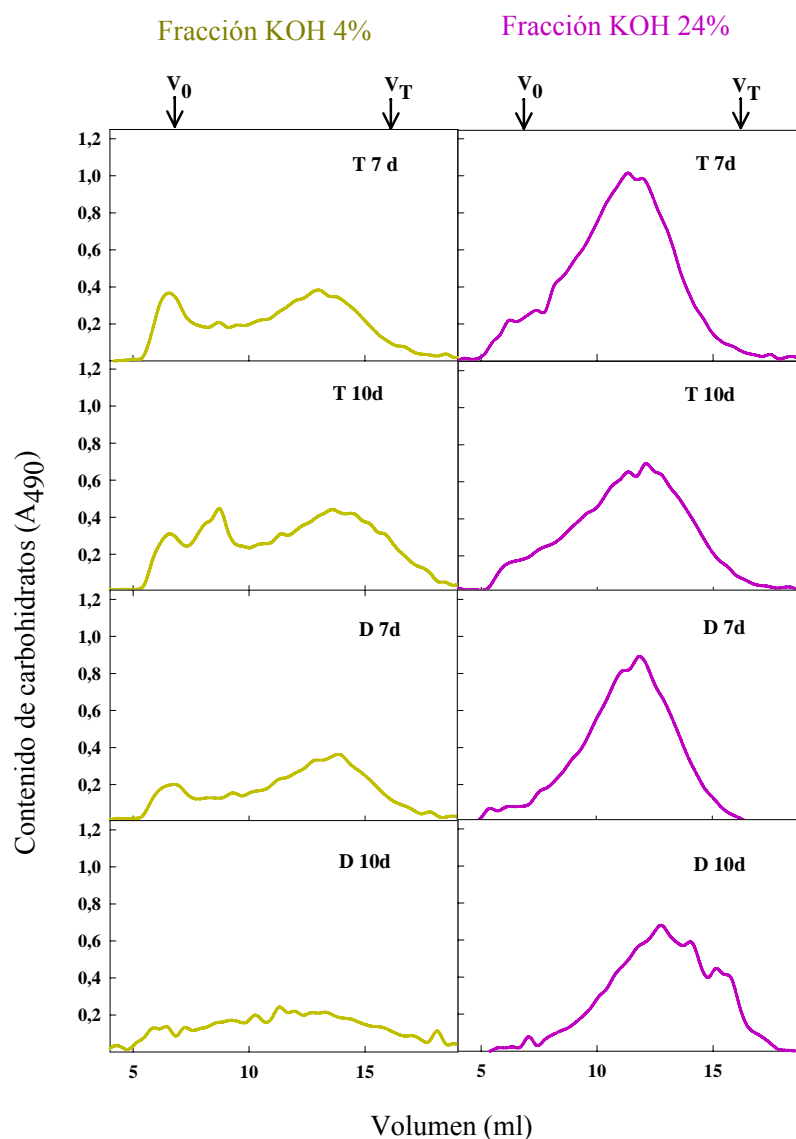


Figura 3.4. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos blandos (cv. Newstar) de las fracciones KOH 4% y KOH 24%, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. Frutos testigo (T) y frutos dañados (D) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento. V_0 , volumen vacío; V_T , volumen total.

Por otro lado los glicanos entrecruzantes unidos fuertemente (Fracción KOH 24%) sólo presentaron un pico de polisacáridos de medio y bajo peso molecular. Sin embargo, en los testigos se observó cercano al volumen vacío (V_0) un hombro indicando una pequeña proporción de polisacáridos de alto peso molecular. En los frutos dañados a los 7 días, dicho hombro desapareció, y el pico se desplazó levemente a la derecha, indicando una despolimerización. A los 10 días, esta degradación fue aún más evidente.

3.3.4 Solubilización, composición de azúcares neutros y despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes de la pared celular en cerezas ‘Sweetheart’.

En esta variedad caracterizada por tener frutos firmes, los frutos testigo evidenciaron una disminución en la proporción de ácidos urónicos (Cuadro 3.10) en la fracción CDTA, pero no en las fracciones H₂O y Na₂CO₃ donde se produjo el aumento de los mismos desde los 7 a los 10 días. Por otro lado, si bien hay presencia de urónicos en las fracciones KOH 4 y 24% (glicanos entrecruzantes unidos débil y fuertemente) no hubo una variación significativa de los mismos desde los 7 a los 10 días ni por tratamiento, en parte coincidente con los rendimientos (Cuadro 3.4). El contenido de urónicos en la fracción H₂O fue mayor en los frutos testigo que en los dañados vinculado además con el mayor rendimiento de esta fracción en los frutos testigo (Cuadro 3.4).

En los frutos dañados, la fracción CDTA tuvo un mayor valor inicial de urónicos en comparación con los frutos testigo, pero también se produjo la disminución de urónicos hacia el día 10 de iniciado el experimento. En estos frutos, también se produjo en la fracción Na₂CO₃ el aumento del contenido de urónicos hacia los 10 días, al igual que en los controles.

Cuadro 3.10 Contenido de ácidos urónicos en miligramos por gramo de AIR de las fracciones de pared celular de cerezas ‘Sweetheart’ en frutos dañados y testigo a los 7 y 10 días de realizado el tratamiento.

Fracción	Contenido de ácidos urónicos (mg/g de AIR)			
	Dañados		Testigo	
	7 d	10 d	7 d	10 d
H ₂ O	33,5 ± 1,5 a	30,6 ± 1,8 a	41,7 ± 3,2 b	51,9 ± 0,9 c
CDTA	104,9 ± 2,7 c	75,2 ± 2,6 b	73,6 ± 0,5 b	64,8 ± 0,1 a
Na ₂ CO ₃	84,3 ± 1,1 a	148,6 ± 0,6 d	113,2 ± 2,4 b	127,6 ± 3,1 c
KOH 4%	11,7 ± 4,6 a	11,9 ± 2,8 a	7,8 ± 1,2 a	9,7 ± 0,8 a
KOH 24%	3,6 ± 1,1 a	6,0 ± 2,2 a	4,2 ± 0,1 a	3,8 ± 0,3 a

Los valores representan las medias ± desvío estándar (n=3). Las letras indican diferencias significativas dentro de cada fracción de pared celular (fila) entre fechas y tratamientos (p<0,05).

Analizando la proporción de urónicos (Cuadro 3.11) de las 5 fracciones de los 4 AIRs se observó un comportamiento similar en los frutos testigo al del Cuadro 3.9, donde disminuyó la proporción de urónicos en la fracción CDTA, desde el día 7 al 10 de iniciado el experimento pero también se observó un aumento de los mismos en las fracciones H₂O y Na₂CO₃. Las fracciones KOH al igual que en el cuadro 3.10 no presentaron diferencias significativas entre los días 7 y 10.

Por el contrario, en los frutos dañados no se observó disminución de la proporción de urónicos, sino un aumento de dicha proporción en las fracciones Na₂CO₃ y KOH 24%, y cambios no significativos en las demás fracciones. En comparación con los frutos testigo, en los dañados no se produjo una variación significativa de la proporción de urónicos en la fracción CDTA, mientras que la proporción de urónicos en la fracción H₂O de los frutos dañados fue menor.

Cuadro 3.11 Contenido de ácidos urónicos en porcentaje (%) de las fracciones de pared celular de cerezas ‘Sweetheart’ en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de realizado el tratamiento.

Fracción	Contenido de ácidos urónicos (%)			
	Dañados		Testigo	
	7 d	10 d	7 d	10 d
H ₂ O	35,7 ± 1,6 ab	32,3 ± 1,9 a	40,5 ± 3,1 b	46,8 ± 0,8 c
CDTA	61,1 ± 1,5 b	61,5 ± 2,1 bc	65,0 ± 0,5 c	56,8 ± 0,0 a
Na ₂ CO ₃	44,9 ± 0,6 a	68,0 ± 0,3 c	46,8 ± 1,0 a	51,6 ± 1,2 b
KOH 4%	6,9 ± 2,7 a	7,5 ± 1,8 a	4,4 ± 0,7 a	5,9 ± 0,5 a
KOH 24%	5,1 ± 1,6 a	8,9 ± 0,5 b	7,2 ± 0,1 ab	7,0 ± 0,5 ab

Los valores representan las medias ± desvío estándar (n=3). Las letras indican diferencias significativas dentro de cada fracción de pared celular (fila) entre fechas y tratamientos (p<0,05).

El contenido de azúcares neutros de los frutos dañados (Cuadro 3.12) disminuyó entre los 7 y los 10 días para las fracciones H₂O y Na₂CO₃, mientras que las fracciones KOH 4% y 24% (glicanos unidos débil y fuertemente) no presentaron variaciones significativas entre los 7 y 10 días de iniciado el experimento.

En los frutos testigo (Cuadro 3.12), se produjo la pérdida de azúcares neutros en la fracción KOH 4% hacia el día 10, mientras que estos aumentaron en las fracciones CDTA y Na₂CO₃. Las fracciones que no presentaron variaciones fueron H₂O y KOH 24% en coincidencia con sus rendimientos (Cuadro 3.4). No hubo diferencias significativas entre frutos dañados y testigos a los 7 días en cuanto al contenido de azúcares neutros pero sí a los 10 días, donde se registró una disminución en las fracciones pécticas en los frutos dañados.

Cuadro 3.12 Contenido de azúcares neutros en miligramos por gramo de AIR de las fracciones de pared celular de cerezas ‘Sweetheart’ en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.

Fracción	Contenido de azúcares neutros (mg/g de AIR)			
	Dañados		Testigo	
	7 d	10 d	7 d	10 d
H ₂ O	39,2 ± 0,6 b	32,7 ± 0,9 a	40,8 ± 0,3 b	41,6 ± 3,0 b
CDTA	18,2 ± 1,7 a	24,2 ± 2,0 b	15,9 ± 1,2 a	29,3 ± 0,8 c
Na ₂ CO ₃	80,8 ± 3,4 bc	65,2 ± 2,8 a	76,4 ± 3,6 b	87,7 ± 0,6 c
KOH 4%	47,8 ± 5,1 ab	47,7 ± 1,5 ab	52,2 ± 1,7 b	41,2 ± 4,5 a
KOH 24%	36,0 ± 0,7 a	28,4 ± 8,7 a	33,5 ± 0,0 a	29,8 ± 0,4 a

Los valores representan las medias ± desvío estándar (n=3). Las letras indican diferencias significativas dentro de cada fracción de pared celular (fila) entre fechas y tratamientos (p<0,05).

La proporción de azúcares neutros (Cuadro 3.13) se vio más afectada por los daños mecánicos dado que hubo una disminución en la proporción de azúcares hacia los 10 días en las fracciones H₂O, Na₂CO₃ y KOH 24% y un aumento en la fracción CDTA. La única fracción que no presentó variaciones en la proporción de azúcares ni tuvo diferencias significativas entre tratamientos fue KOH 4%. Sin embargo, los frutos dañados a los 7 días presentaron una mayor proporción de azúcares en la fracción Na₂CO₃ y menor en CDTA y KOH 24% que los frutos testigo.

En los frutos testigo, hubo muy pocas variaciones entre los 7 y 10 días, salvo en la fracción CDTA, en la que al igual que en los frutos dañados, se produjo un aumento significativo de la proporción de azúcares. No obstante, también se observó un leve aumento en la fracción Na₂CO₃.

Cuadro 3.13 Contenido de azúcares neutros en porcentaje (%) de las fracciones de pared celular de cerezas ‘Sweetheart’ en frutos dañados y testigos a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.

Fracción	Contenido de azúcares neutros (%)			
	Dañados		Testigo	
	7 d	10 d	7 d	10 d
H ₂ O	41,8 ± 0,7 c	34,4 ± 0,9 a	39,7 ± 0,3 bc	37,5 ± 2,7 ab
CDTA	10,6 ± 1,0 a	19,8 ± 1,6 c	14,1 ± 1,1 b	25,7 ± 0,7 d
Na ₂ CO ₃	43,1 ± 1,8 c	29,8 ± 1,3 a	31,6 ± 1,5 a	35,5 ± 0,2 b
KOH 4%	28,3 ± 3,0 a	30,2 ± 1,0 a	29,8 ± 1,0 a	25,1 ± 2,7 ab
KOH 24%	51,5 ± 0,9 b	42,5 ± 0,7 a	56,9 ± 0,0 d	54,6 ± 0,7 c

Los valores representan las medias ± desvío estándar (n=3). Las letras indican diferencias significativas dentro de cada fracción de pared celular (fila) entre fechas y tratamientos (p<0,05).

Según el análisis de la composición de la pared celular en función de sus azúcares neutros se puede observar que la arabinosa (Ara) también es el azúcar predominante en esta variedad. En los frutos dañados, la Ara presentó un aumento de su proporción en las fracciones H₂O, Na₂CO₃ y KOH 24% y una leve disminución en la fracción KOH 4% al pasar de 7 días a 10 días. Mientras tanto en los testigos, se produjo aumentos sólo en las fracciones H₂O y KOH 4% y leves disminuciones en Na₂CO₃ y KOH 24%. Otro de los azúcares neutros importantes es la galactosa (Gal) la cual disminuyó desde los 7 a los 10 días en la fracción H₂O tanto en los frutos dañados como en los testigos. Además este azúcar no pareció variar en las fracciones Na₂CO₃ y KOH 24% en ambos tratamientos y días. No obstante, en los frutos testigo se produjo una leve disminución de la Gal en las fracciones CDTA y KOH 4% desde los 7 a los 10 días.

La ramnosa (Ram), azúcar que forma parte de los ramnagalacturonanos (pectinas) se encuentra presente en esta variedad. Solamente en la fracción Na₂CO₃ disminuyó levemente en los frutos dañados desde los 7 a los 10 días, mientras que en los frutos testigo ocurrió lo contrario. En la fracción KOH 4% (glicanos entrecruzantes unidos débilmente) se observó una menor concentración de este azúcar en los frutos testigo.

Otros azúcares neutros como la xilosa (Xil), manosa (Man), glucosa (Glc) y la fucosa (Fuc), también se encontraron presentes (Cuadro 3.14). De estos, la fucosa y la manosa no presentaron cambios para ambos tratamientos y días. La xilosa presente en mayor proporción en los glicanos entrecruzantes, presentó algunas diferencias. En la fracción KOH 4%, se observó en los frutos dañados un leve aumento hacia los 10 días mientras que se mantuvo la misma proporción en los frutos testigo.

Cuadro 3.14 Composición de azúcares neutros en moles % de cerezas ‘Sweetheart’, en las fracciones de pared celular de frutos dañados (D) y testigo (T) a los 7 y 10 días de iniciado el tratamiento.

Fracción	Tratamiento	Concentración de azúcares neutros (moles%)						
		Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc
H ₂ O	D 7d	7	1	38	5	5	33	10
	D 10 d	7	1	58	7	5	17	6
	T 7 d	7	1	36	5	7	33	11
	T 10 d	7	1	49	6	6	22	8
CDTA	D 7d	10	1	66	8	2	11	2
	D 10 d	9	1	64	10	2	12	2
	T 7 d	12	1	67	2	--	15	3
	T 10 d	12	--	67	4	3	11	3
Na ₂ CO ₃	D 7d	9	1	78	2	tr	8	2
	D 10 d	6	tr	83	2	tr	7	1
	T 7 d	7	1	82	2	tr	8	1
	T 10 d	10	1	78	2	--	8	1
KOH 4%	D 7d	6	1	63	7	3	10	11
	D 10 d	5	1	59	10	4	10	11
	T 7 d	4	1	65	8	3	10	8
	T 10 d	2	1	74	8	3	7	6
KOH 24%	D 7d	3	2	28	18	10	14	26
	D 10 d	3	2	34	18	9	13	22
	T 7 d	3	2	29	19	10	14	23
	T 10 d	2	2	25	22	11	14	24

tr: trazas

En esta variedad, no se evidenció marcadas variaciones en la proporción de todos los azúcares neutros entre frutos dañados y testigos (Figura 3.5). Sin embargo, como en la variedad Newstar, los ácidos urónicos si bien son similares entre testigos y dañados al día 7, aumentan en ambos casos hacia el día 10, haciéndolo en proporción algo mayor en los frutos dañados.

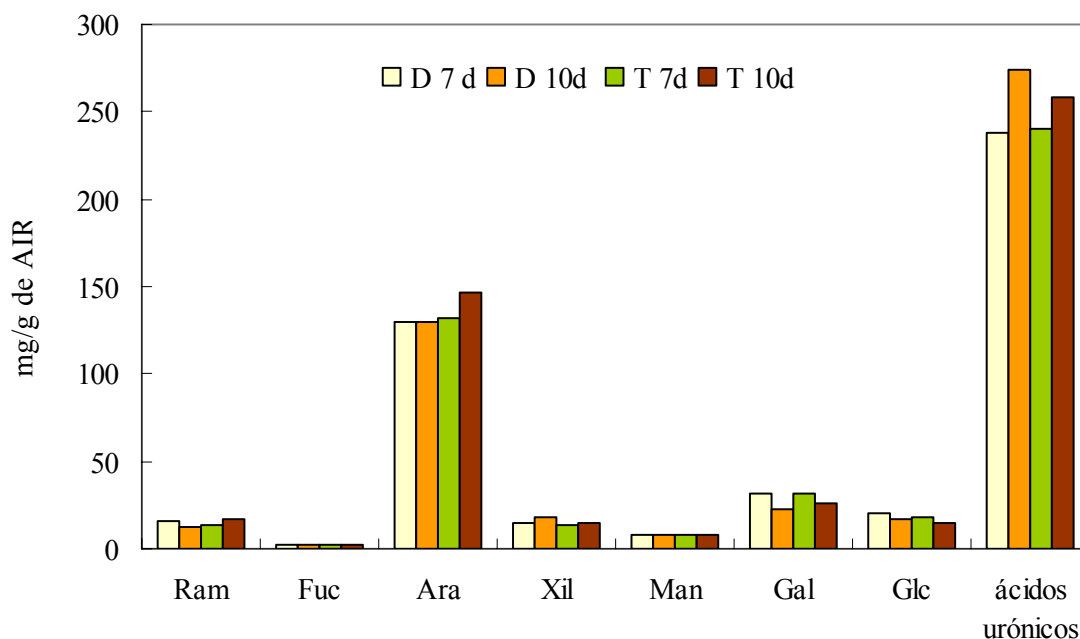


Figura 3.5 Contenido de azúcares neutros y ácidos urónicos en miligramos por gramo de AIR de cerezas ‘**Sweetheart**’, de los tratamientos Dañados (D 7d y D 10d) y Testigos (T 7d y T 10d) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento.

De los perfiles cromatográficos de las pectinas y los glicanos entrecruzantes se observó que la fracción H_2O tuvo un pico amplio, donde en los frutos testigo (Figura 3.6) se observaron polisacáridos de alto y mediano peso molecular mientras que en los frutos dañados a los 7 días se observó un corrimiento indicando una mayor abundancia de polisacáridos de mediano y bajo peso molecular. Esta situación se estabiliza a los 10 días en los frutos dañados donde se observa que los polisacáridos presentes son de mediano peso molecular disminuyendo los más pequeños.

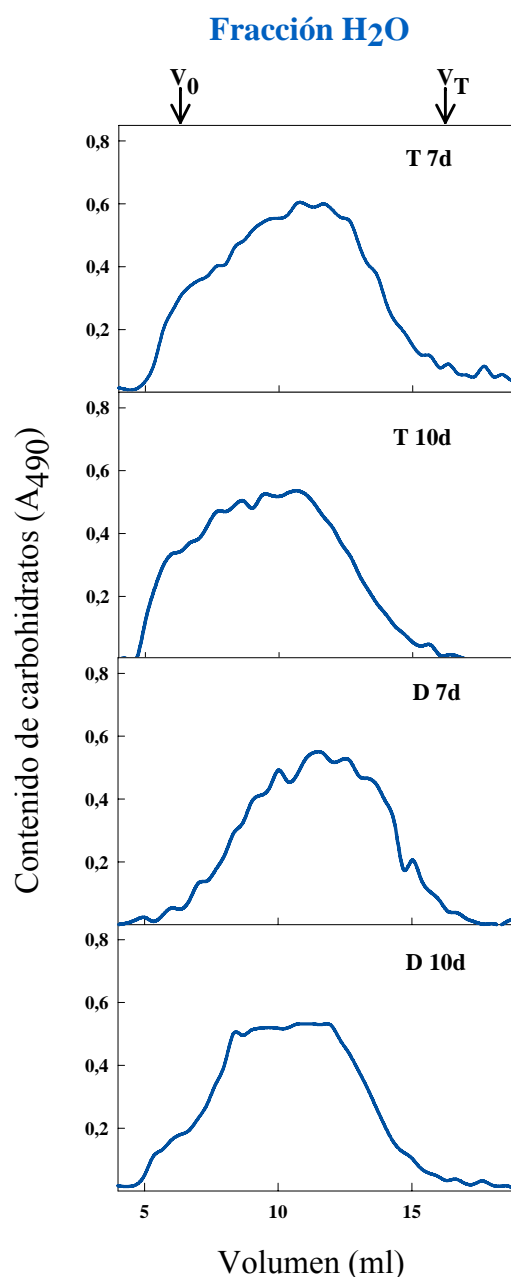


Figura 3.6. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos firmes (cv Sweetheart) de la fracción H₂O, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. Frutos testigo (T) y frutos dañados (D) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento. V₀, volumen vacío; V_T, volumen total.

En la fracción CDTA (Figura 3.7) no se observó despolimerización de pectinas en los frutos testigo a los 7 y 10 días. En estos se diferenciaron dos picos uno de alto y otro de bajo peso molecular bien definidos. No obstante, en los frutos dañados se observó un pico preponderante indicativo de abundantes pectinas de bajo peso molecular y un pico menor de pectinas de alto peso molecular cercano al volumen vacío (V₀) en comparación a los frutos testigo. En los frutos dañados a los 10 días se observó una degradación generalizada de las pectinas.

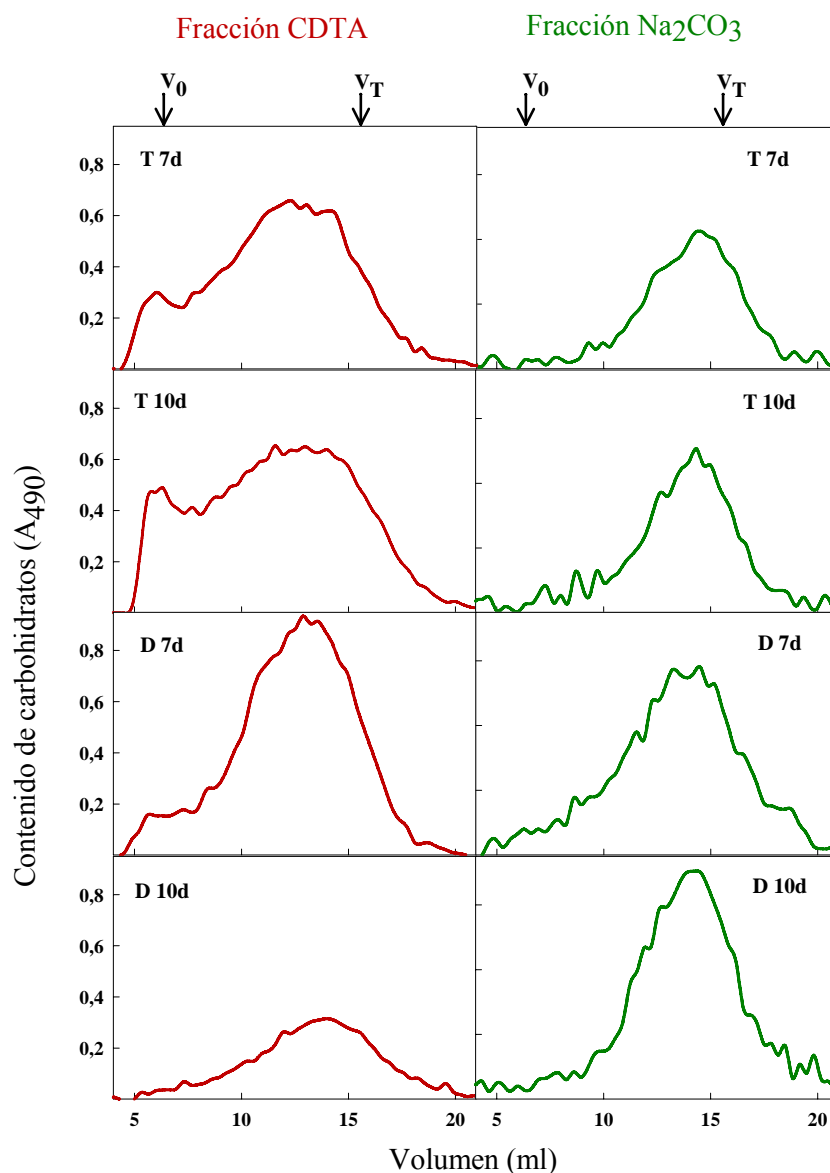


Figura 3.7. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos firmes (cv. Sweetheart) de las fracciones CDTA y Na_2CO_3 , fraccionadas en una columna de Sepharose CL-2B. Frutos testigos (T) y frutos dañados (D) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento. V_0 , volumen vacío; V_T , volumen total.

La fracción Na_2CO_3 (Figura 3.7), correspondiente a pectinas unidas covalentemente, sólo presentó un pico característico de polisacáridos de bajo peso molecular. Sin embargo, en los frutos dañados además se observaron algunos polisacáridos de mediano peso molecular. A los 10 días se observó la pérdida de las moléculas de mediano peso en los frutos dañados agudizándose el pico.

La despolimerización de glicanos entrecruzantes unidos débilmente está representada por la fracción KOH 4% (Figura 3.8), con dos picos característicos de polisacáridos de alto y bajo peso molecular. Tanto en los frutos dañados como testigo

no se observaron diferencias, lo que indicó que no se produjo despolimerización. Solamente a los 10 días siguieron diferenciándose los dos picos pero con menor intensidad y la aparición de polisacáridos de mediano peso molecular.

Por otro lado los glicanos entrecruzantes unidos fuertemente (Fracción KOH 24%) sólo presentaron un pico de polisacáridos de medio y bajo peso molecular. Sin embargo, en los testigos se observaron algunos polisacáridos de alto peso molecular cercano al volumen vacío (V_0). Tanto en los frutos dañados a los 7 como a los 10 días se observó la despolimerización de estos polisacáridos y los de mediano peso molecular.

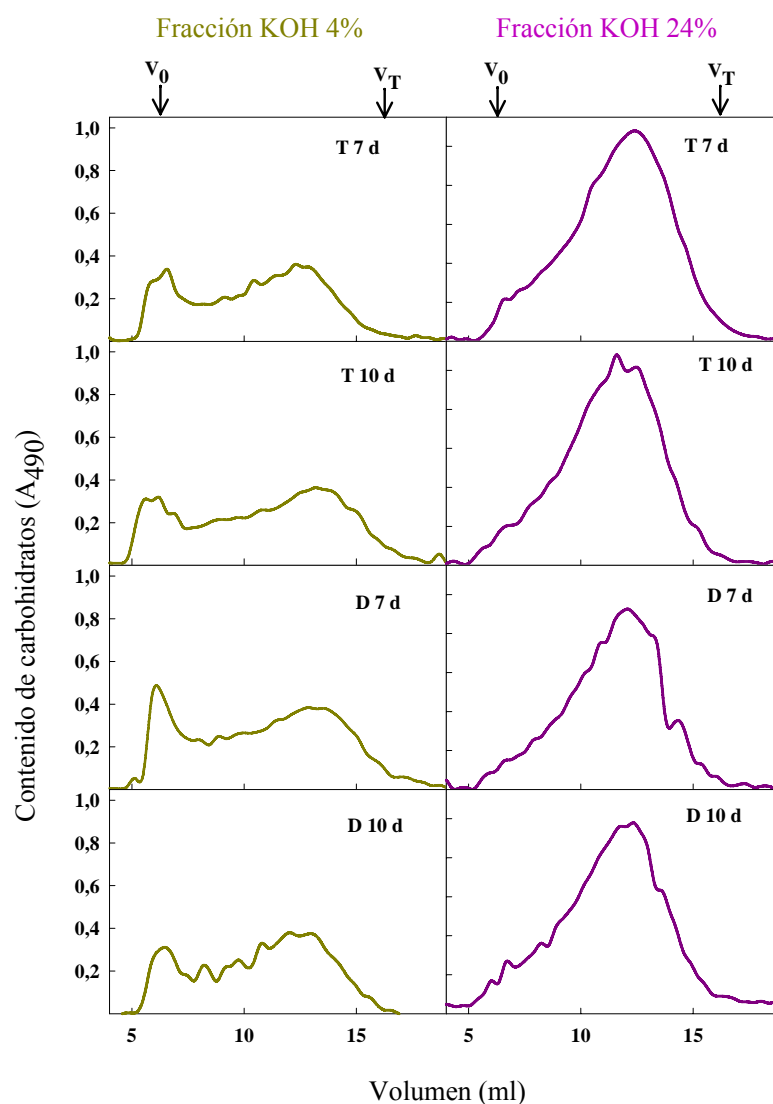


Figura 3.8. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de frutos firmes (cv. Sweetheart) de las fracciones KOH 4% y KOH 24%, fraccionadas en una columna de Sepharose CL-6B. Frutos testigos (T) y frutos dañados (D) a los 7 y 10 días de iniciado el experimento. V_0 , volumen vacío; V_T , volumen total.

3.4 DISCUSIÓN

Las cerezas fueron arrojadas desde una altura de 70 cm, a temperatura ambiente (20°C), a fin de generar daño por impacto, sin embargo también menores alturas de caída provocan daños tal como muestran en sus experimentos con cerezas dulces Crisosto et al. (1993), Lidster y Tung (1980b), Ogawa et al. (1972), y Patten y Patterson (1985). En este trabajo, el daño en cerezas apareció después de 7 días de almacenamiento a 12°C mientras que en otros frutos como damascos (De Martino et al. 2002) y kiwis (Mencarelli et al. 1996), aparecen a los 3 y 6 días después del tratamiento, dependiendo de la temperatura del fruto, la temperatura de almacenamiento y la firmeza inicial de la especie. Más allá de la temperatura a la que se produce el daño mecánico, la lesión se observa en forma de ligeras depresiones o *pitting* y amarronamiento interno (Ogawa et al. 1972) tal como se observó en este trabajo.

Se ha indicado que el daño por impacto es mayor sobre todo en aquellas variedades susceptibles (por ejemplo el cultivar ‘Van’) donde con una altura de caída de tan sólo 2,5 cm ya se producen daños (Patten y Patterson 1985). Las diferencias entre cultivares en cuanto a la susceptibilidad a los daños mecánicos dependen no sólo de factores externos (como el manipuleo rudo durante la cosecha, transporte y operaciones de empaque), sino también de un factor interno como la alta tasa respiratoria tal como determinó Crisosto et al. (1993) en su trabajo sobre cerezas dulces. Coincidentemente, en el presente trabajo se utilizó la variedad Sweetheart, la cual había sido evaluada por Toivonen et al. (2004) como de baja tasa respiratoria y de frutos firmes con respecto a otros cultivares. Anteriormente Facticeau y Rowe (1979) y Facticeau (1982b) observaron en sus trabajos que la firmeza de las cerezas estaba relacionada de forma inversa con la susceptibilidad a los daños habiéndose encontrado que los frutos firmes presentaron menor daño por impacto que los frutos blandos. Sin embargo, también destacan que a veces pueden no estar relacionados debido a variaciones interanuales en las condiciones del cultivo. Toivonen et al. (2004) discrepan en parte, ya que observaron que no existe una relación tan fuerte entre firmeza y susceptibilidad al daño, sino que la firmeza es sólo uno de los factores determinantes.

A pesar de las diferencias interanuales mencionadas anteriormente, Kappel et al. (2006) analizaron la susceptibilidad al daño por impacto de distintas variedades de cerezas, clasificando a ‘Sweetheart’ como una de las variedades menos susceptibles. Justamente, esta variedad fue utilizada en este trabajo de tesis, evidenciándose que además de ser más firme, tiene una mayor duración en postcosecha luego de producido el daño (datos no presentados).

Para explicar las diferencias en AIR entre frutos testigo y dañados se puede hacer mención al trabajo de De Martino et al. (2006) en tomate: se observó que en la zona de daño por impacto las células del mesocarpo de tomate aparecen comprimidas y escurridas. Probablemente ésto podría haber ocurrido también con las cerezas, ya que al expeler el contenido celular el peso fresco es menor y el rendimiento de AIR es mayor por peso fresco. Otra posible explicación del aparente aumento de AIR se deba a que, como sucede en peras ‘D’Anjou’, durante el proceso de cicatrización de heridas, se produce el espesamiento de la pared celular y acumulación de pectinas y compuestos fenólicos en la zona de la herida que actúan como barrera ante posibles infecciones y se previene la pérdida de agua de las células subyacentes (Spotts et al. 1998).

Por otro lado, el contenido de AIR de ambas variedades fue similar en los frutos testigo a los 7 y 10 días, lo cual indicaría que no hay relación entre AIR y firmeza inicial de la variedad. Otros autores como Facticeau (1982b) y Lidster et al. (1980a) asociaron el mayor contenido de AIR con mayor firmeza, alto contenido de materia seca y menor susceptibilidad al daño mecánico.

En el trabajo de Van linden et al. (2008) se analizó el efecto del daño por impacto en tomates sobre la constitución de la pared celular. En el mismo, el autor asegura que este tipo de daño no produjo cambios significativos sobre la solubilidad de pectinas o el grado de polimerización, con un análisis a solo tres horas del impacto. Sin embargo, los autores sugieren que un mayor tiempo de incubación post-daño mostraría un mayor efecto sobre la pared celular en general, y en la red de xiloglucanos en particular. Además se debe tener en cuenta que este tipo de daño o *pitting* se hace aparente después de un período de almacenamiento a baja temperatura (Looney et al. 1996a). Así es como en el presente trabajo, el daño por impacto observado a los 7 días después del tratamiento tuvo efecto sobre la constitución de la pared celular de las cerezas. La variedad Newstar de frutos blandos, parece ser la más afectada por el daño mecánico, con una mayor cantidad de pectinas en la fracción CDTA y una menor de pectinas unidas covalentemente de la fracción Na_2CO_3 . No obstante, en estos frutos el daño mecánico alteró más sensiblemente a las pectinas solubles en agua que al resto de las fracciones. Algo similar ocurrió en peras Huanghua (*Pyrus pyrifolia* Nakai, cv. Huangua), pero con otro tipo de daño mecánico, como el daño por vibración durante el transporte, donde se observaron daños superficiales y también internos los cuales afectaron la integridad de la membrana plasmática y se produjo una disminución del contenido total de pectinas (Zhou et al. 2007).

Cabe resaltar que el contenido de glicanos entrecruzantes fue mayor en frutos firmes y aún más en aquellos frutos dañados, en consecuencia estos glicanos le impartirían resistencia a la fractura en células de frutas maduras, tal como indican Lidster et al. (1980b). Simultáneamente, la suma total de pectinas en los frutos firmes fue mayor que en los frutos blandos y además se mantuvo invariable entre los frutos testigo y dañados. Así en conjunto, las pectinas y los glicanos entrecruzantes con las microfibrillas de celulosa representarían un modelo de fruto más resistente al daño por impacto en los frutos firmes.

Existen pocos trabajos que analicen los cambios en la pared celular debido a los daños mecánicos. Estos daños suponen una degradación de la pared celular con lo cual se vería afectada la composición de pectinas y glicanos entrecruzantes. Teniendo en cuenta que el contenido de pectinas totales fue mayor en frutos firmes, y también lo fue el contenido de ácidos urónicos, no se observaron sin embargo diferencias del contenido de urónicos entre tratamientos. En cambio, en los frutos blandos a pesar de poseer una menor cantidad de pectinas y ácidos urónicos, se observó un gran aumento de los mismos a los 10 días y más aún en los frutos dañados, algo similar a lo que ocurre en peras en proceso de cicatrización de heridas (Spotts et al. 1998).

En pepinos (*Cucumis sativus* L. cv. Heinz 3534) expuestos a daño mecánico, se observó el aumento de ácidos urónicos de forma diferencial en la zona carpelar pero no en el mesocarpo y de forma inversa se produjo la disminución de azúcares neutros en el mesocarpo con importantes pérdidas de manosa y galactosa (Miller 1989). En cerezas también se observó una gran pérdida de azúcares neutros en las fracciones pécticas y en la de glicanos entrecruzantes en aquellos frutos dañados en los frutos blandos, sin embargo en los frutos firmes sólo se observó ésta pérdida en las pectinas unidas covalentemente (fracción Na_2CO_3) sobre todo a los 10 días. Del análisis de la

composición de azúcares neutros se desprende que a diferencia de lo que ocurre en pepinos, se produce la pérdida del contenido total de arabinosa, galactosa y xilosa en frutos blandos pero no ocurre lo mismo en frutos firmes. Si bien no se sabe a ciencia cierta cuál es la actividad de las enzimas degradativas de la pared celular en cerezas tras la exposición al daño mecánico, en otros frutos como tomate, en respuesta a las heridas producidas se redujo la expresión de estas enzimas, iniciando las vías de reparación (Chung et al. 2006). Por otro lado, Van linden et al. (2008) también observaron en tomates expuestos a daños mecánicos un ligero aumento de la actividad de las enzimas pectinmetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG) pero no pudieron observar despolimerización de pectinas 3 horas después del daño mecánico. En cambio, en cerezas se pudo observar con un tiempo de incubación mayor, la despolimerización tanto de pectinas como glicanos entrecruzantes en frutos blandos pero en frutos firmes sólo se produjo la despolimerización de pectinas.

3.5 CONCLUSIONES

En este estudio se acepta la hipótesis que enuncia que el daño mecánico en cerezas dulces induce modificaciones en los polisacáridos de la pared celular de la zona afectada. Evidentemente el daño mecánico produjo un aumento del AIR obtenido en ambas variedades aunque se observaron claras diferencias entre frutos blandos y firmes en la composición de la pared celular.

Los frutos denominados blandos (cv Newstar), de baja firmeza inicial, mostraron un menor contenido de ácidos urónicos a los 7 días con respecto a los frutos firmes, además registraron solubilización de pectinas unidas covalentemente y aumento de aquellas unidas iónicamente, pérdida de azúcares neutros (arabinosa, galactosa y xilosa) y despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes después de producirse el daño.

En cambio en los frutos firmes (cv. Sweetheart), los cuales mostraron una firmeza inicial elevada, el nivel de ácidos urónicos fue alto pero sorprendentemente también hubo un aumento del contenido de urónicos hacia los 10 días, y más aún en los frutos dañados, al igual que ocurría en los frutos blandos. También se produjo la solubilización de pectinas unidas covalentemente pero sólo se registró aumento de las pectinas iónicamente unidas a los 7 días de producirse el daño. A diferencia de los frutos blandos no se registraron pérdidas de azúcares neutros en los frutos dañados y la despolimerización no se produjo de manera tan amplia en todas las fracciones como en los frutos blandos, sino casi exclusivamente en las fracciones pécticas.

El daño por impacto produce en cerezas firmes y blandas cambios en la composición de la pared celular de forma diferencial, en la que también intervienen otros factores no analizados aquí como la actividad de las enzimas degradativas de pared en cerezas. Poco se sabe en este tipo de fruto expuesto a daño mecánico a nivel enzimático y sería de vital importancia identificar aquellas enzimas más activas para poder determinar una estrategia que mitigue la pérdida de calidad de los frutos afectados. Por otra parte, otro factor importante puede surgir del plano hormonal, ya que se conoce el efecto del ácido giberélico para reducir la susceptibilidad a los daños mecánicos y aumentar la firmeza de los frutos.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES GENERALES

La cereza dulce (*Prunus avium* L.) es una fruta muy perecedera por lo que luego de cosechada se deben extremar las medidas de manejo para evitar que inicie su senescencia y pueda llegar a destino manteniendo sus cualidades organolépticas. Para lograr este objetivo, es conveniente elegir variedades cuyos frutos sean firmes, resistentes al manipuleo, a los daños mecánicos y las enfermedades, aunque también se pueden adoptar diversas medidas antes o después de la cosecha. El manejo implica el uso de giberelinas y/o calcio, el uso de atmósferas modificadas y controladas junto con la conservación en frío para mantener la integridad y firmeza de los frutos (Looney et al. 1996a).

Uno de los factores más estudiados relacionados con la conservación de la cereza, es el ablandamiento de la fruta durante la maduración, lo cual determina en gran medida su vida en postcosecha. Para esto se han encarado diversos trabajos orientados hacia la caracterización de la estructura de la pared celular, la cual le confiere rigidez a la célula y al tejido del fruto (Barbier y Thibault 1982; Batisse et al. 1994; Batisse et al. 1996a; Batisse 1996b; Choi et al. 2002a; Fils-Lycaon y Buret 1990), y por otro lado se investigó sobre las diferentes enzimas que degradan la pared celular y cómo es su actividad durante la maduración y ablandamiento de los frutos (Alonso et al. 2006; Andrews y Shulin 1994, 1995; Barret y González 1994; Gerardi et al. 2001; Thibault 1983).

Hasta el momento muchos trabajos se han enfocado en la descripción de los componentes de la pared celular de diversos frutos como cerezas dulces (Barbier y Thibault 1982; Batisse et al. 1994; Batisse et al. 1996a; Batisse et al. 1996b; Choi et al. 2002a; Facteau 1982b; Fils-Lycaon y Buret 1990), mango (*Mangífera indica* L., Muda et al. 1995), grosellero negro (*Ribes nigrum* L.), arándano (*Vaccinium myrtillus* L., Hilz et al. 2005), frambuesa (*Rubus idaeus*, Vicente et al. 2007), tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill., Huber y O'Donoghue 1993; Mitcham et al. 1989; Redgwell et al. 1997b), kiwi (*Actinidia deliciosa* y *A. chinensis*, Redgwell et al. 1992 y 1997b; Sauvageau et al. 2010), palta (*Persea americana*, Huber y O'Donoghue 1993; Redgwell et al. 1997b), sandía (*Citrullus lanatus*, Redgwell et al. 1997b), manzana (*Malus domestica* Borkh., Barret y Northcote 1965; Redgwell et al. 1997b; Yoshioka et al. 1992), durazno (*Prunus persica* L. Batsch, Brummell et al. 2004; Kurz et al. 2008; Yoshioka et al. 2011), nectarina (*Prunus persica* L. Batsch var. nectarina [Ait] maxim, Dawson et al. 1992; Ortiz et al. 2010), damasco (*Persea americana* L., Kurz et al. 2008), frutilla (*Fragaria ananassa*, Redgwell et al. 1997b), pera asiática (*Pyrus serotina*, Redgwell et al. 1997b), pera (*Pyrus communis* L., Ahmed y Labavitch 1980; Yoshioka et al. 1992), ciruela (*Prunus domestica* y *P. salicina*, Ponce et al., 2010; Redgwell et al. 1997b; Renard y Ginies 2009), zarzamora (*Rubus fruticosus*, Redgwell et al. 1997b), uva (*Vitis vinífera* L., Nunan et al. 1998; Vidal et al. 2001; Yakushiji et al. 2001), zapallo (*Cucurbita* sp., Kurz et al. 2008) y membrillo japonés (*Chaenomeles japonica*, Thomas y Thibault 2002).

En estos trabajos y en las revisiones hechas por Goulao y Oliveira (2008) y Brummell (2006) se puede observar que en general durante la maduración de los frutos, se produce la pérdida de azúcares neutros como arabinosa y/o galactosa a partir de la solubilización y despolimerización de pectinas. Sin embargo, analizando caso por caso

se presentan situaciones diferentes, ya que además, las técnicas para el análisis de la pared celular se han ido modernizando a través de los años.

En este trabajo de tesis se decidió estudiar las características particulares de la pared celular que estén relacionadas al diferente comportamiento en firmeza de las cerezas y de esta manera se tomó como objetivo principal analizar los cambios en la pared celular durante la ontogenia de las cerezas dulces (*Prunus avium* L.). Si bien ambas variedades tienen buena aceptación por parte del consumidor, la variedad Newstar presenta un gran ablandamiento hacia madurez (San Martino et al. 2008) lo que limita su vida en estantería y duración en almacenamiento (Brummell y Harpster 2001).

En consonancia al objetivo planteado, en el capítulo 2 se caracterizaron las modificaciones que se producen en la pared celular de los frutos de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) durante el crecimiento y maduración en dos cultivares de firmeza contrastantes. Para esto se pusieron a prueba tres hipótesis: En la primera de ellas se introdujo el concepto de que el estado ontogénico determina modificaciones en la constitución de la pared celular de las dos variedades de cerezas en estudio; en la segunda, los cambios en la pared celular de las cerezas dulces se asociarían en primer término a una despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes, unidos más o menos estrechamente a la celulosa. Este proceso ocurriría a través de casi toda la ontogenia del fruto; por último, en la tercera hipótesis se planteó que, durante la adquisición de textura fundente, el ablandamiento de las cerezas dulces se vincularía además con la pérdida de azúcares neutros de pectinas y glicanos entrecruzantes.

Como resultado del análisis de la pared celular se pudo observar que efectivamente en cada uno de ellos se modifican tanto el contenido de pectinas y glicanos entrecruzantes como la concentración y composición de azúcares neutros en los cuatro estadios estudiados. Al mismo tiempo se observó que disminuía la firmeza mientras aumentaba el peso fresco y el contenido de sólidos solubles de los frutos, y corroborándose parcialmente la segunda hipótesis ya que la despolimerización sólo se produjo en los glicanos entrecruzantes fuertemente unidos (extraídos con KOH 24%). Además la solubilización de pectinas sólo se produjo en la variedad de frutos blandos (cv. Newstar).

Durante la ontogenia, se corroboró parcialmente la tercera hipótesis, ya que tanto en frutos firmes como blandos se pudo demostrar que hubo pérdida de azúcares neutros sólo en las fracciones pécticas. No obstante, teniendo en cuenta la composición de estos azúcares, se observó que en frutos firmes no se produjo una pérdida, mientras que en frutos blandos hubo una pérdida importante de galactosa.

A través de los años se ha comprobado que los daños mecánicos producen cambios externos e internos en los frutos, siendo las cerezas dulces particularmente sensibles ya que desarrollan una fisiopatía conocida como *pitting*, la cual disminuye su valor económico. Los estudios sobre cerezas han analizado el efecto del daño mecánico en diferentes cultivares sobre la firmeza, el contenido de sólidos solubles, y la respiración (Crisosto et al. 1993; Toivonen et al. 2004), como así también el efecto de la temperatura sobre la incidencia de este tipo de daño (Facteau y Rowe 1979; Lidster y Tung 1980a; Ogawa et al. 1972). En cambio, todavía no se ha analizado en cerezas qué ocurre a nivel de pared celular como consecuencia del daño mecánico. Sólo un trabajo realizado en pepino (*Cucumis sativus* L.) relacionado al daño mecánico, menciona la pérdida de azúcares neutros como manosa y galactosa y un aumento del contenido de ácidos urónicos (Miller 1989).

Por lo antes mencionado, en el presente trabajo, se planteó como otro de los objetivos principales (Capítulo 3), evaluar los efectos potenciales del daño mecánico por impacto en postcosecha, sobre la constitución de la pared celular de los frutos firmes (cv. Sweetheart) y blandos (cv. Newstar) de cerezo dulce. Evidentemente el daño mecánico produjo un aumento del AIR obtenido de ambas variedades, aunque se observaron claras diferencias entre frutos blandos y firmes en la composición de la pared celular. Los resultados indican que los frutos dañados presentaron un menor contenido de ácidos urónicos que los frutos testigo, siendo la disminución aún más significativa en los frutos blandos (Figs. 3.1 y 3.5).

En los frutos blandos dañados se da una situación paralela a la maduración (capítulo 2) ya que se produce la solubilización de pectinas, sobre todo las unidas covalentemente (fracción Na_2CO_3), y un aumento de aquellas unidas iónicamente (fracción CDTA), pérdida de azúcares neutros (arabinosa, galactosa y xilosa). Pero además, no sólo se produjo la despolimerización de glicanos entrecruzantes sino también la de pectinas debido al daño causado.

En cambio, en contraposición a lo que ocurre en el experimento de ontogenia, los frutos firmes dañados presentan una pérdida o solubilización de pectinas unidas covalentemente. En estos frutos no se registró pérdidas de azúcares neutros y se produjo una despolimerización más acentuada de las fracciones pécticas.

Cuadro 4.1 Resumen de la comparación entre variedades de cerezas dulces firmes y blandas para las diferentes variables analizadas durante el crecimiento y maduración del fruto y cuando la fruta fue dañada mecánicamente. ++ a + representan una escala de mayor a menor contenido o intensidad.

PROCESO DE ABLANDAMIENTO DE CEREZAS	
VARIEDAD FIRME	VARIEDAD BLANDA
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Despolimerización de glicanos entrecruzantes ▪ + Contenido total de azúcares neutros a madurez ▪ + Disminución del contenido total de ácidos urónicos a madurez 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pérdida de galactosa ▪ Despolimerización de glicanos entrecruzantes ▪ ++ Contenido total de azúcares neutros a madurez ▪ ++ Disminución del contenido total de ácidos urónicos a madurez ▪ Solubilización de pectinas
IMPACTO DEL DAÑO MECÁNICO SOBRE LA PARED CELULAR DE CEREZAS	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Despolimerización de pectinas ▪ No varía la proporción de pectinas unidas covalentemente ▪ + Disminuye el contenido de ácidos urónicos en las pectinas unidas covalentemente ▪ No varía el contenido de azúcares neutros en las pectinas unidas covalentemente 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Despolimerización de pectinas y glicanos entrecruzantes ▪ Disminuye la proporción de pectinas unidas covalentemente ▪ ++ Disminuye el contenido de ácidos urónicos en las pectinas unidas covalentemente (Solubilización de pectinas) ▪ Disminuye el contenido de azúcares neutros en las pectinas unidas covalentemente ▪ Disminuye la proporción de azúcares neutros en todas las fracciones

4.1 IMPLICANCIAS AGRONÓMICAS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

En este trabajo no se analizó el efecto de las características edafo-climáticas de la ubicación de estos cultivares, teniendo en cuenta que esto podría influir sobre la respuesta del frutal a estas condiciones y afectando en consecuencia al crecimiento del fruto. Aún así estos frutos poseen diferente firmeza ya que han sido analizados previamente (San Martino et al. 2008; Yommi et al. 2002), con lo cual se pudo caracterizar los cultivares Sweetheart y Newstar como de frutos firmes y blandos respectivamente.

Como se mencionara anteriormente, la vida postcosecha del fruto está relacionada a la firmeza de éste y su mantenimiento desde que es cosechado hasta que llega al consumidor. Por esto, se busca a través del mejoramiento genético la obtención de nuevos cultivares que entre otros ítems, produzcan frutos de buena firmeza y con largos períodos de conservación (Bargioni 1996).

Mientras tanto se han buscado tratamientos alternativos que promuevan una mayor firmeza de los frutos como la aplicación de giberelinas y calcio en precosecha ya sea separados o combinados (Flore et al. 1996; Looney 1996b; Pugh et al. 2007). El calcio por un lado actúa como puente divalente entre cadenas de ácido galacturónico no esterificado creando estructuras en forma de “caja de huevo”, lo que le confiere mayor rigidez a la célula. La aplicación de este metal se ha utilizado en algunos cultivares con efectos variables según el cultivar, por lo que en algunas ocasiones se prefiere realizar un recambio de cultivares por aquellos con frutos más firmes. Sin embargo, algunos estudios realizados en el país indican que en las variedades Lapins y Sweetheart, la aplicación de calcio no tuvo efecto sobre la firmeza (Pugh et al. 2007) mientras que en otras variedades como Newstar y Sunburst la aplicación de Ca aumentó la firmeza (Pugh et al. 2007) y la capacidad de ser crocante al mismo tiempo que disminuyó el calibre del fruto (Raffo et al. 2003). Por lo tanto, el conocimiento de la estructura de la pared celular permitiría relacionar porqué en frutos firmes este nutriente no tiene efecto sobre la firmeza y sí lo tiene sobre frutos blandos. En consecuencia, se podría inferir que la aplicación de Ca dificultaría la solubilización de pectinas en el caso de los frutos blandos (cv. Newstar) y por esto los frutos serían más firmes. En cambio la aplicación de Ca en frutos firmes no tendría efecto ya que en éstos no se produce la solubilización de pectinas.

Por otro lado, la aplicación de ácido giberélico (AG_3) en precosecha de cerezas ha demostrado, en algunas variedades, incrementar la firmeza y el contenido de sólidos solubles (Choi et al. 2002b; Clayton et al. 2003; Facticeau et al. 1985; Kappel y MacDonald 2002) sobre todo en genotipos de maduración tardía (Choi et al. 2002b). Al mismo tiempo, esta hormona regula el ablandamiento controlando la actividad de las enzimas hidrolíticas de pared, evitando la pérdida de azúcares neutros y la solubilización de pectinas unidas covalentemente (Kondo y Danjo 2001), retrasando así el tiempo de maduración (Facticeau et al. 1985). En el presente trabajo, los frutos firmes no presentan una marcada solubilización de pectinas ni pérdida de azúcares neutros por lo cual se podría pensar que la aplicación de giberelinas tendría efecto en los frutos blandos. Además se ha observado que la aplicación de AG_3 disminuye la actividad de las enzimas poligalacturonasa (PG) y Cx-celulasa como así también retarda el desarrollo del color rojo característico (Andrews y Shulin 1995). Por último, el efecto más importante del uso de esta hormona es que puede suprimir o retardar el desarrollo de pitting en los frutos dañados (Looney 1996b; Looney y Lidster 1980).

4.2 APORTES ORIGINALES SURGIDOS DE LA TESIS.

1. *Diferencias de composición de pared celular entre cerezas dulces firmes y blandas*: La variabilidad no sólo se encuentra entre especies sino también dentro de una misma especie, tal como se puede observar en este estudio, donde los cultivares analizados poseen distinto comportamiento en cuanto a firmeza. En el proceso de ablandamiento ocurren cambios característicos de la especie en cuestión, tal como se ha desarrollado en algunos trabajos de revisión. En

consecuencia, la identificación de la composición de la pared celular es un aporte al conocimiento sobre el ablandamiento de estos frutos que, como característica principal son no climatéricos, y por lo tanto el proceso de maduración difiere de los frutos climatéricos más estudiados como tomate y manzana.

2. *Importancia del conocimiento de la composición de la pared celular en relación con el uso y efecto de los reguladores de crecimiento o minerales:* Estos permiten mantener o mejorar la calidad de la fruta en postcosecha, ya que es un fruto muy perecedero pero con un alto valor económico. Por lo tanto, la estructura de la pared celular podría explicar y predecir en parte porqué no todos los cultivares de cerezas presentan una respuesta frente a la aplicación de estos productos y también sería útil para el desarrollo e investigación en nuevos tratamientos pre y/o postcosecha.
3. *Efecto del daño mecánico sobre la pared celular de cerezas como fruto no climatérico:* Si bien el daño mecánico en los frutos climatéricos estimula la síntesis de etileno acelerando la maduración, en el caso de las cerezas esto no ocurre por presentar un comportamiento no climatérico y en consecuencia no se desencadena ni la producción de etileno ni la maduración sino más bien se acelera el inicio de la senescencia del fruto. La senescencia es un proceso irreversible de desintegración celular, con lo cual la estructura de la pared celular juega un rol importante en la susceptibilidad o resistencia de los frutos firmes y blandos a los daños mecánicos y su vida en postcosecha.

4.3 POSIBLES LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN GENERADAS A PARTIR DE ESTE TRABAJO

- * Identificación de genes marcadores durante la maduración, los cuales podrían ayudar a predecir la textura y el comportamiento del ablandamiento de los frutos antes que el frutal comience a cargar fruta (Harker et al. 1997), lo cual disminuiría el tiempo para obtener nuevos cultivares.
- * Análisis del contenido de calcio en la pared celular en frutos firmes y blandos. Esto permitiría explicar si el contenido de calcio difiere marcadamente entre frutos firmes y blandos, comprobando si la aplicación de este nutriente no es efectiva en frutos firmes porque el empaquetamiento de pectinas es alto, mientras que si en frutos blandos la concentración fuera más baja, podría explicarse que la solubilización de pectinas fuera más factible.
- * Análisis de la actividad de las enzimas degradativas de pared celular en frutos firmes y blandos. Hasta el momento se sabe que no todas las enzimas que actúan sobre la pared celular tienen un efecto directo sobre el ablandamiento del fruto, como es el caso de la enzima poligalacturonasa (Smith et al. 1988). En cerezas, se ha analizado la actividad enzimática durante la maduración, pero no se sabe hasta el momento si actúan de forma diferencial en frutos firmes y blandos, esto es, actuando en estadíos más tempranos en las variedades blandas y viceversa en las variedades firmes.

- * Análisis de la actividad de las enzimas de degradación de pared en frutos de distinta firmeza expuestos a daños mecánicos, como así también de aquellas enzimas relacionadas con la síntesis de ácido jasmónico. Se ha observado en tomate que por efecto del daño mecánico no hay un aumento significativo de la actividad de las enzimas poligalacturonasa, pectinesterasa, β -galactosidasa (Chung et al. 2006; Van linden 2008), por lo que el daño en cerezas también podría producir un efecto similar. Si bien el ácido jasmónico se ha utilizado en duraznos en los cuales produce un retraso de la maduración, en cerezas el efecto debería ser estudiado ya que es un fruto no climatérico y por ende no es notoria la producción autocatalítica de etileno.
- * Estudio nano-estructural de la pared celular de cerezas dulces firmes y blandas. Mediante el uso del Microscopio de Fuerza Atómica (MFA) se podría describir y medir la nano-estructura de los polisacáridos como se ha hecho en cerezas chinas (Chen et al. 2009).
- * Análisis de la estructura química de los polisacáridos de las paredes celulares de cerezas de distintas variedades, estadíos y con diferentes niveles de daño. El análisis fino de las cadenas laterales de las pectinas, así como el de las hemicelulosas podrían servir para complementar lo estudiado en esta Tesis, así como entender los procesos de despolimerización, pérdida de cadenas laterales y modificación de las mismas por maduración o por daño mecánico.

CAPITULO 5

Bibliografía

- Ahmed EA, Labavitch JM (1980) Cell wall metabolism in ripening fruit. I. Cell wall changes in ripening 'Bartlett' pears. *Plant Physiology* 65:1009-1013
- Alonso J, Rodríguez MT, Canet W (2006) Purification and characterization of four pectinesterases from sweet cherry (*Prunus avium* L.) *J. Agric. Food Chem.* 44, 3416-3422
- Altube HA, Santinoni LA, Alem HJ (2007) Introducción a la fruticultura. Pp 3-40. En Sozzi GO (Ed.), Árboles frutales: Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina
- Andrews PK, Shulin L (1994) Partial purification and characterization of β -D-galactosidase from sweet cherry, a non climateric fruit. *J. Agric. Food Chem.* 42:2177-2182
- Andrews PK, Shulin L (1995) Cell wall hydrolytic enzyme activity during development of nonclimateric sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *J. Hort. Sci.* 70:561-567
- Barbier M, Thibault JF (1982) Pectic substances of sweet cherry. *Phytochemistry* 21:11-115
- Bargioni G (1996) Sweet cherry scions: characteristics of the principal commercial cultivars, breeding objectives and methods. Pp. 73-112. En: Webster AD, Looney NE (Eds.) *Cherries: Crop physiology, production and uses*. Wallingford, UK. CAB International.
- Barret AJ, Northcote DH (1965) Apple fruit pectic substances. *Biochem. J.* 94:617-627
- Barret DM, Gonzalez C (1994) Activity of softening enzymes during cherry maturation. *J. Food Sci.* 59:574-577.
- Batisse C, Fils-Lycaon B, Buret M (1994) Pectin changes in ripening cherry fruit. *J. Food. Sci.* 59:389-393.
- Batisse C, Buret M, Coulomb PJ, Coulomb C (1996a) Ultrastructure of different textures of Bigarreau Burlat cherries during maturation. *Can. J. Bot.* 74:1974-1981.
- Batisse C, Buret M, Coulomb PJ (1996b) Biochemical differences in cell wall of cherry fruit between soft and crisp fruit. *J. Agric. Food. Chem.* 44:453-457.
- Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ, Stone BA (1983) A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.* 113:291-299.
- Børve J, Sekse L, Stensvand A (2000). Cuticular fractures promote postharvest fruit rot in sweet cherries. *Plant Dis.* 84:1180-1184
- Bourne MC (1979) Texture of temperate fruit. *J. Texture Stud.* 10:25-44
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry.* 54:484-489
- Brummell DA, Harpster MH (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47:311-340

- Brummell DA, Dal Cin V, Crisosto CH, Labavitch JM (2004) Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *J. Exp. Bot.* 55:2029-2039
- Brummell DA. (2006) Cell wall disassembly in ripening fruits. *Functional Plant Biology* 33:103-119.
- Caffall KH, Mohnen D (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*. 344:1879-1900
- Campana BMR. (2007) Índices de madurez, cosecha y empaque de frutas. Pp.705-768. En: Sozzi GO (Ed.) Árboles Frutales: Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3:1-30
- Carpita NC, Mc Cann MC (2000) The cell wall. Pp. 52-108. En: Buchanan B, Gruissem W, Jones R (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists
- Carrington CMS, Greeve LC, Labavitch JM (1993) Cell wall metabolism in ripening fruit. VI. Effect of the antisense polygalacturonase gene on cell wall changes accompanying ripening in transgenic tomatoes. *Plant Physiology* 103:429-434
- Chen F, Zhang L, An H, Yang H, Sun X, Liu H, Yao Y, Li L (2009) The nanostructure of hemicellulose of crisp and soft Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* L.) cultivars at different stages of ripeness. *LWT – Food Science and Technology* 42:125-130
- Choi C, Toivonen P, Wiersma PA, Kappel F (2002a) Differences in levels of pectic substances and firmness in fruit from six sweet cherry genotypes. *Journal American Pomological Society* 56:197-201
- Choi C, Wiersma PA, Toivonen P, Kappel F (2002b) Fruit growth, firmness and cell wall hydrolytic enzyme activity during development of sweet cherry fruit treated with gibberellic acid (GA₃). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77:615-621
- Christensen VJ (1995) Evaluation of fruit characteristics of 20 sweet cherry cultivars. *Fruit Varieties Journal*. 49:113-117.
- Chung TT, West G, Tucker GA (2006) Effect of wounding on cell wall hydrolase activity in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 40:250-255.
- Clayton M, Biasi WV, Agar IT, Southwick SM, Mitcham E J (2003) Postharvest quality of 'Bing' cherries following preharvest treatment with hydrogen cyanamide, calcium ammonium nitrate, or gibberellic acid. *HortScience* 38:407–411
- Cosgrove DJ (2001) Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiology* 125:131-134.
- Crisosto CH, Garner D, Doyle J, Day KR (1993) Relationship between fruit respiration, bruising susceptibility and temperature in sweet cherries. *HortScience* 28:132-135

- Crisosto CH (1994) Stone fruit indices: a descriptive review. *Postharvest News and Information* 5:65N-68N
- Dawson DM, Melton LD, Watkins CB (1992) Cell wall changes in nectarines (*Prunus persica*) Solubilization and depolymerization of pectic and neutral polymers during ripening and in mealy fruit. *Plant Physiology* 100:1203-1210
- De Martino G, Massantini R, Botondi R, Mencarelli F (2002) Temperature affects impact injury on apricot fruit. *Postharvest Biology and Technology* 25:145-149
- De Martino G, Vizovitis K, Botondi R, Bellincontro A, Mencarelli F (2006) 1-MCP controls ripening induced by impact injury on apricots by affecting SOD and POX activities. *Postharvest Biology and Technology* 39:38-47
- Duan X, Cheng G, Yang E, Yi C, Ruenroengklin N, Lu W, Luo Y, Jiang Y, (2008) Modification of pectin polysaccharides during ripening of postharvest banana fruit *Food Chemistry* 111:144-149
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Dekers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356
- Esti M, Cinquanta L, Sinesio F, Moneta E, Di Matteo M (2002) Physicochemical and sensory fruit characteristics of two sweet cherry cultivars after cool storage. *Food Chemistry* 46:399-405
- Facteau TJ, Rowe KE. (1979) Factors associated with surface pitting of sweet cherries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104:706-710
- Facteau TJ (1982a) Levels of pectic substances and calcium in gibberellic-treated sweet cherry fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 107:148-151
- Facteau TJ (1982b) Relationship of soluble solids, alcohol-insoluble solids, fruit calcium, and pectin levels to firmness and surface pitting in 'Lambert and 'Bing' sweet cherry fruit.. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 107:151-154
- Facteau TJ, Rowe KE, Chestnut NE (1985) Response patterns o gibberellic acid-treated sweet cherry fruit at different soluble solids levels and leaf/fruit ratios. *Scientia Horticulturae* 27:257-262
- FAOSTAT (2008) Exportación de cultivos: Exportación de cerezas. Página web: <http://faostat.fao.org>
- FAOSTAT (2009) Producción de cultivos: Producción de cerezas. Página web: <http://faostat.fao.org>
- Filisetti-Cozzi TMCC, Carpita NC (1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.* 197:157-162
- Fils-Lycaon B, Buret M (1990) Loss of firmness and changes in the pectic fractions during ripening and overripening of sweet cherry. *HortScience* 25:777-778
- Flore JA, Kesner CD, Webster AD (1996) Tree canopy management and the orchard environment: principles and practices of pruning and training. Pp 259-277. En: Webster AD y Looney NE (Eds.) *Cherries: Crop Physiology, Production and Uses*. CAB International, Wallingford, UK
- García JL, Ruiz-Altisent M, Barreiro P (1995) Factors influencing mechanical properties and bruise susceptibility of apples and pears. *J. Agric. Eng. Res.* 61:11-18

- Gerardi C, Blando F, Santino A, Zacheo G (2001) Purification and characterization of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Science* 160:795-805
- Goulao LF, Oliveira CM (2008) Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology* 19:4-25
- Gross K, Sams C (1984) Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry* 23:2457-2461
- Ha M-A, Apperley DC, Jarvis MC (1997) Molecular Rigidity in Dry and Hydrated Onion Cell Walls. *Plant Physiology* 115:593-598
- Harker FR, Redgwell RJ, Hallett IC, Murray SH (1997) Texture of fresh fruit. *Hort. Rev.* 20:121-224
- Hilz H, Bakx EJ, Schols HA, Voragen AGJ (2005) Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries-characterisation in berries, juice, and press cake. *Carbohydrate polymers* 59:477-488
- Huber DJ (1984) Strawberry (*Fragaria ananassa*) fruit softening, the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science* 49:1310-1315
- Huber DJ, O'Donoghue EM (1993) Polyuronides in avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. *Plant physiology* 102:473-480
- Jarvis MC. (2011) Plant cell walls: Supramolecular assemblies. *Food hydrocolloids* 25:257-262
- Kader AA, Mitchell FG (1989) Postharvest physiology. Pp. 158-164. En: La Rue JH, Johnson RS (Eds.) *Peaches, Plums and Nectarines: Growing and Handling for Fresh Market*. University of California Department of Agriculture and Natural Resources Publication No. 3331.
- Kappel F, MacDonald RA (2002) Gibberellic acid increases fruit firmness, fruit size, and delays maturity of 'Sweetheart' sweet cherry. *Journal of American Pomological Society* 56:219-222
- Kappel, F, Toivonen P, Stan S, McKenzie D-L (2006) Resistance of sweet cherry cultivars to fruit surface pitting. *Can. J. Plant Sci.* 86:1197-1202
- Keegstra K, Talmadge K, Bauer WD, Albersheim P (1973) The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiology* 51:188-196
- Kondo S, Danjo C (2001) Cell wall polysaccharide metabolism during fruit development in sweet cherry 'Satohnishiki' as affected by gibberellic acid. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 70:178-184
- Kurz C, Carle R, Schieber A (2008) Characterisation of cell wall polysaccharide profiles of apricots (*Prunus armeniaca* L.), peaches (*Prunus persica* L.), and pumpkins (*Cucurbita* sp.) for the evaluation of fruit product authenticity. *Food chemistry* 106:421-430
- Le Goff A, Renard CMGC, Bonnin E, Thibault J-F (2001) Extraction, purification, and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydrate polymers* 45:325-334

- Lidster PD, Muller K, Tung MA (1980a) Effects of maturity on fruit composition and susceptibility to surface damage in sweet cherries. *Can. J. Plant Sci.* 60:865-871
- Lidster PD, Tung MA (1980b) Effects of fruit temperatures at time of impact damage and subsequent storage temperature and duration on the development of surface disorders in sweet cherries. *Can. J. Plant Sci.* 60:555-559
- Looney NE, Lidster PD (1980) Some growth regulator effects on fruit quality, mesocarp composition, and susceptibility to postharvest surface marking of sweet cherries. *Journal of the American Society of Horticulture Science* 105:130–134
- Looney NE, Webster AD, Kupferman EM (1996a) Harvest and handling sweet cherries for the fresh market. Pp 411-441. En: Webster AD y Looney NE (Eds.) *CHERRIES: Crop Physiology, Production and Uses*. CAB International, Wallingford, UK.
- Looney NE (1996b) Principles and practice of plant bioregulator usage in cherry production. Pp 279-295. En: Webster AD y Looney NE (Eds.) *CHERRIES: Crop Physiology, Production and Uses*. CAB International, Wallingford, UK.
- Marcus SE, Verherbruggen Y, Herve C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL (2008) Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biology* 8:60
- Mencarelli F, Massantini R, Botondi R (1996) Influence of impact surface and temperature on the ripening response of kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology*. 8:165-177.
- Mitcham EJ, Gross KC, Ng TJ (1989) Tomato fruit cell wall synthesis during development and senescence. *Plant Physiology* 89: 477- 481
- Miller AR (1989) Mechanical stress-induced changes in sugar composition of cell walls from cucumber fruit tissues. *Phytochemistry* 28:389-392
- Mohnen D (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11:266-277
- Muda P, Seymour GB, Errington N, Tucker GA (1995) Compositional changes in cell wall polymers during mango fruit ripening. *Carbohydrate Polymers* 26:255-260
- Nunan KJ, Sims IM, Bacic A, Robinson SP, Fincher GB (1998) Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant physiology* 118:783-792
- Oechslin R, Lutz MV, Amado R (2003) Pectic substances isolated from apple cellulosic residue: structural characterisation of a new type of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Polymers* 51:301–310
- O'Donnell PJ, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser HMO, Bowles DJ (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274:1914-1917
- Ogawa JM, Bose E, Manji BT, Schreader WR (1972) Bruising of sweet cherries resulting in internal browning and increased susceptibility to fungi. *Phytopathology* 62:579-580
- Ortiz A, Seymour GB, Tucker GA, Lara I (2010) Cell wall disassembly during the melting phase of softening in 'Snow Queen' nectarines. *Postharvest biology and technology*. 58:88-92

- Pallardy SG (2008) Reproductive growth. Pp. 87-106. Physiology of woody plants. 3ra ed. Academic Press, Elsevier Inc. London, UK.
- Palou L, Crisosto CH, Garner D, Basinal LM (2003) Effect of continuous exposure to exogenous ethylene during cold storage on postharvest decay development and quality attributes of stone fruits and table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 27:243-254
- Patten KD, Patterson ME (1985) Fruit temperature effects on mechanical damage of sweet cherries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110:215-219
- Pérez-Vicente A, Martínez-Romero D, Carbonell A, Serrano M, Riquelme F, Guillén F, Valero D (2002) Role of polyamines in extending shelf life and their reduction of mechanical damage during plum (*Prunus salicina* Lindl.) storage. *Postharvest Biology and Technology* 25:25-32
- Ponce NMA, Ziegler VH, Stortz CA, Sozzi GO (2010) Compositional Changes in Cell Wall Polysaccharides from Japanese Plum (*Prunus salicina* Lindl.) during Growth and On-Tree Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:2562–2570
- Pugh B, Manavella FA, San Martino L (2007) Cosecha y postcosecha. Pp 153-165. En: Cittadini ED y San Martino L (Eds.) *El cultivo de cerezos en Patagonia sur. Tecnología de manejo, empaque y comercialización*. Ediciones INTA, Argentina.
- Raffo D, Candan AP, Calvo P, Sánchez E. (2003) Ensayo en cerezas: Aplicaciones foliares de calcio y calidad de fruta. *Rompecabezas tecnológico*. INTA 39:10-15
- Redgwell RJ, Melton LD, Brasch DJ (1992) Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Solubilization of the pectic polymers. *Plant Physiology* 98:71-81
- Redgwell RJ, MacRae E, Hallett I, Fischer M, Perry J, Harker R (1997a) In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta* 203:162-173
- Redgwell RJ, Fischer M, Kendal E, MacRae EA (1997b) Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* 207:174-181
- Redgwell RJ, Fischer M (2002) Fruit texture, cell wall metabolism and consumer perception. Pp. 46-88. En: Knee, M. (Ed.). *Fruit Quality and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK.
- Renard CMGC, Ginies C (2009) Comparison of the cell wall composition for flesh and skin from five different plums. *Food chemistry* 114:1042-1049
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D (2001) Pectins: structure biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57:929-967
- Rose JKC, Catalá C, González-Carranza ZH, Roberts JA (2003) Cell wall disassembly, Pp. 264-324. En: Rose, J.K.C. (Ed.). *The Plant Cell Wall*. Annual Plant Reviews Series. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- San Martino L, Manavella FA, García DA, Salato GS (2008) Phenology and Fruit Quality of Nine Sweet Cherry Cultivars in South Patagonia. *Acta Hort. (ISHS)* 795:841-848

- Sanz CE, Onofre F (2007) Portainjertos y variedades. Pp. 31-43. En: Cittadini ED, San Martino L (Eds.) El cultivo de cerezos en Patagonia sur: Tecnología de manejo, empaque y comercialización.
- Sauvageau J, Hinkley SF, Carnachan SM, and Sims IM (2010) Characterisation of polysaccharides from gold kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch. 'Hort16A'). Carbohydrate polymers. 82:1110-1115.
- Scheller HV, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. Annu. Rev. Plant Biol. 61:263-289.
- Serrano M. (2005) Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53:2741-2745.
- Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (2009) Cerezo. Servicio Nacional de Seguridad Animal (SENASA). Página web: <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/cerezo>
- Smith CJS, Watson JR, Bird CR, Morris PC, Schuch W, Grierson D (1988) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. Nature 334:724-726
- Sozzi GO, Greve LC, Prody GA, Labavitch JM (2002) Gibberellic acid, synthetic auxins, and ethylene differentially modulate α -L-arabinofuranosidase activities in antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic synthase tomato pericarp discs. Plant Physiology 129:1330-1340
- Sozzi GO (2004) Strategies for the regulation of postharvest fruit softening by changing cell wall enzyme activity. Pp. 135-172. En: Dris, R. y Jain, S.M. (Eds.), Production Practices and Quality Assessment of Food Crops, Vol. 4: Postharvest Treatment and Technology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Sozzi GO, Civello PM (2005) Fruit cell wall enzymes as targets for biotechnology. Pp. 214-249. En: Thangadurai D, Pullaiah T, Pinheiro de Carvalho MA (Eds.), Genetic Resources and Biotechnology, Vol I. Regency Publications, New Delhi.
- Spotts RA, Sanderson PG, Lennox CL, Sugar D, Cervantes LA (1998) Wounding, wound healing and staining of mature pear fruit. Postharvest Biology and Technology 13:27-36
- Srinivasan C, Padilla IMG, Scorza R (2005) *Prunus* spp. Almond, apricot, cherry, nectarine, peach and plum. Pp. 512-542. En: Litz, R.E. (Ed.), Biotechnology of Fruit and Nut Crops. CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Taiz L, Zeiger E (2002) The plant cell. En Taiz L, Zeiger E (Eds) Plant Physiology, 3ra edición. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Talbott LD, Ray PM (1992) Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides: Effects of auxin and turgor. Plant Physiology 98:369-379
- Thibault J-F (1983) Enzymatic degradation and β -elimination of the pectic substances in cherry fruits. Phytochemistry 22:1567-1571.
- Thomas M, Thibault J-F (2002) Cell-wall polysaccharides in the fruits of Japanese quince (*Chaenomeles japonica*): extraction and preliminary characterisation. Carbohydrate Polymers 49:345-355

- Toivonen PMA, Kappel F, Stan S, McKenzie DL, Hocking R (2004) Firmness, respiration, and weight loss of 'Bing', 'Lapins' and 'Sweetheart' cherries in relation to fruit maturity and susceptibility to surface pitting. *HortScience* 39:1066-1069
- Tukey HB (1942) Time interval between full bloom and fruit maturity for several varieties of apples, pears, peaches and cherries. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 40:133-140
- Turner SH, Cherniak R (1981) Total characterization of polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 95:137-144
- Underhill SJR, McLauchlan RL, Dahler JM (1998) Flavedo and albedo changes in 'Eureka' lemons caused by static compression and impact loading. *J. Texture Stud.* 29:437-452
- Van linden V, Scheerlinck N, Desmet M, De Baerdemaeker J (2006) Factors that affect tomato bruise development as a result of mechanical impact. *Postharvest Biology and Technology* 42:260-270
- Van linden V, Sila DN, Duvetter T, De Baerdemaeker J, Hendrickx M (2008) Effect of mechanical impact-bruising on polygalacturonase and pectinmethylesterase activity and pectic cell wall components in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 47:98-106
- Van Zeebroeck M, Van linden V, Ramon H, De Baerdemaeker J, Nicolaï BM, Tijskens E (2007) Impact damage of apples during transport and handling. *Postharvest Biology and Technology* 45:157-167
- Vicente AR, Ortugno C, Powell ALT, Greve LC, Labavitch JM (2007) Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 1. Analysis of raspberry (*Rubus idaeus*). *J. Agric. Food Chem.* 55:4119-4124
- Vidal S, Williams P, O'Neill MA, Pellerin P (2001) Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 45:315-323
- Wakabayashi K, Chun J-P, Huber DJ (2000) Extensive solubilization and depolymerization of cell wall polysaccharides during avocado (*Persea americana*) ripening involves concerted action of polygalacturonase and pectinmethylesterase. *Physiologia Plantarum* 108:345-352
- Wang KLC, Li H, Ecker JR. (2002) Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell* S131-S151
- Wiersma PA, Fils-Lycaon BR (1996) Molecular cloning and nucleotide sequence (accession no. U39228) of a betaglucosidase cDNA from ripening sweet cherry fruit. *Plant Physiology* 110:337
- Yakushiji H, Sakurai N, Morinaga K (2001) Changes in cell wall polysaccharides from the mesocarp of grape berries during veraison. *Physiologia Plantarum* 111:188-195
- Yommi A, Godoy C, Horvitz S, López Camelo AF (2002) Crecimiento y evolución de la calidad durante la maduración organoléptica en cerezas 'Newstar', 'Lapins' y 'Sweetheart'. *Boletín técnico de INTA n°154*. Argentina

- Yoshioka H, Aoba K, Kashimura Y (1992) Molecular weight and degree of methoxylation in cell wall polyuronide during softening in pear and apple fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117:600-606
- Yoshioka H, Hayama H, Tatsuki M, Nakamura Y (2011) Cell wall modifications during softening in melting type peach 'Akatsuki' and non-melting type peach 'Mochizuki'. *Postharvest Biology and Technology* 60:100-110
- Zarifneshat S, Ghassemzadeh HR, Sadeghi M, Abbaspour-Fard MH, Ahmadi E, Javadi A Shervani-Tabar MT (2010) Effect of Impact Level and Fruit Properties on Golden Delicious Apple Bruising. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 5:114-121
- Zhou R, Su S, Yan L, Li Y (2007) Effect of transport vibration levels on mechanical damage and physiological responses of Huanghua pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai, cv. Huanghua). *Postharvest biology and technology* 46:20-28
- Zykwinska AW, Ralet MCJ, Garnier CD, Thibault JFJ (2005) Evidence for *in vitro* binding of pectin side chains to cellulose. *Plant physiology* 139:397-407